

**UNIVERSIDAD AUTONOMA
“GABRIEL RENE MORENO”**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRICOLAS
CARRERA DE BIOLOGIA**




***“DETERMINACIÓN DE LA EXISTENCIA DEL FENÓMENO DE
TRANSMISIÓN TRANSOVÁRICA EN POBLACIONES DE Aedes
aegypti (Diptera: Culicidae) DURANTE LA EPIDEMIA DE DENGUE
2007 EN LA CIUDAD DE SANTA CRUZ – BOLIVIA”***

Tesis de grado para optar por el título de:
Licenciada en Ciencias Biológicas.

Presentada por:
Mirian Cruz Zambrana

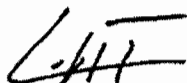
Santa Cruz – Bolivia – 2009

La tesis de grado “**DETERMINACIÓN DE LA EXISTENCIA DEL FENÓMENO DE TRANSMISIÓN TRANSOVÁRICA EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) DURANTE LA EPIDEMIA DE DENGUE 2007 EN LA CIUDAD DE SANTA CRUZ DE LA SIERRA – BOLIVIA**” presentado por Mirian Cruz Zambrana, para optar el título de Licenciada en Ciencias Biológicas. Siendo esta revisada, corregida y aprobada por los asesores y tribunales asignados; la Directora de Carrera de Biología y el Decano de la Facultad de Ciencias Agrícolas.



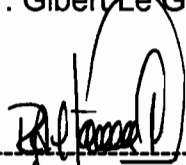
Dr. Jean Pierre Hervé

Asesor



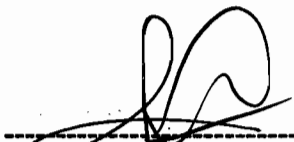
Dr. Gibert Le Goff

Asesor



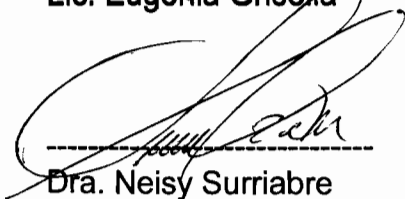
Lic. Raul Altamirano

Tribunal



Lic. Eugeria Grisolia

Tribunal



Dra. Neisy Surriabre

Tribunal



Lic. Ana Maria Mostacedo

Directora de la Carrera
de Biología



Ing. MSc. Nelson Rodríguez

Decano de la Facultad de
Ciencias Agrícolas

DEDICATORIA

A Dios por concederme la vida y haberme dado la oportunidad de cumplir esta meta.

Con una enorme gratitud dedico este trabajo a la persona que me ha dado la vida, que me ayuda y me comprende en todo momento, mi madrecita; y a mi padre por el sacrificio constante para sacarme adelante.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
INDICE GENERAL.....	v-viii
INDICE DE TABLAS.....	ix
INDICE DE FIGURAS.....	x
INDICE DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Definición e historia del dengue.....	1
1.2. Sobrevivencia del virus.....	3
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. Objetivo General.....	5
2.2. Objetivos Específicos.....	5
3. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
3.1. Agente etiológico.....	6
3.2. Técnicas de aislamiento del virus.....	8
3.2.1. Células de mamífero.....	8
3.2.2. Cultivos celulares de mosquitos.....	9
3.3. Diagnóstico molecular.....	10
3.3.1. Inmunofluorescencia.....	10
3.3.1.1. Principio de la técnica.....	11
3.3.2. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	12
3.3.3. RT-PCR (Retrotranscriptasa/ Reacción en cadena de Polimerasa).....	15
3.3.3.1. Electroforesis.....	16
3.4. Vectores.....	17

3.4.1. Taxonomía del vector.....	18
3.4.2. Biología de <i>Ades aegypti</i>	18
3.4.2.1. Huevo.....	19
3.4.2.2. Larvas.....	20
3.4.2.3. Pupa.....	22
3.4.2.4. Adulto.....	22
3.4.3. Ecología del adulto.....	24
3.4.3.1. Emergencia.....	24
3.4.3.2. Apareamiento.....	24
3.4.3.3. Alimentación.....	24
3.4.3.4. Ciclo gonadotrófico.....	25
3.4.3.5. Rango de vuelo.....	25
3.4.3.6. Conducta de reposo.....	26
3.4.3.7. Longevidad.....	26
3.4.3.8. Criaderos.....	26
3.5. Historia de transmisión trasovárica.....	27
3.5.1. Transmisión transovárica en mosquitos.....	28
3.5.2. Transmisión transovárica en <i>Ades aegypti</i>	29
3.5.3. Transmisión transovárica en el aboratorio.....	30
3.5.4. Transmisión transovárica en la naturaleza.....	30
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
4.1. Materiales.....	31
4.1.1. Materiales de campo.....	31
4.1.2. Material de laboratorio entomológico.....	31
4.1.3. Materiales de laboratorio Biología Molecular.....	32
4.1.3.1. Extracción del vius.....	33
4.1.3.2. RT-PCR.....	33
4.1.3.3. PCR.....	34
4.1.3.4. Electroforesis.....	34

DETERMINACIÓN DE LA EXISTENCIA DEL FENÓMENO DE TRANSMISIÓN TRANSOVÁRICA EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) DURANTE LA EPIDEMIA DE DENGUE 2007 EN LA CIUDAD DE SANTA CRUZ – BOLIVIA.. Cruz Zambrana Mirian

4.1.3.5. Inoculación celular.....	34
4.1.3.6. Inmunofluorescencia.....	35
4.1.4. Análisis estadístico.....	35
4.1.5. Materiales de gabinete.....	35
4.2. Métodos.....	36
4.2.1. Ubicación del área de estudio.....	36
4.2.1.1. Muestreo en la ciudad de Santa Cruz.....	36
4.2.1.2. Muestreo en el Barrio San Luís.....	37
4.2.2. Metodología a seguir.....	37
4.2.1.1. Ovitrapas.....	38
4.2.1.2. Encuesta larval.....	42
4.2.1.3. Captura de adultos.....	43
4.2.3. Extracción del ARN viral.....	45
4.2.4. Cepas control.....	45
4.2.5. RT-PCR (Reverso transcripción – Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	46
4.2.6. Heminested PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	47
4.2.7. Aislamiento viral.....	48
4.2.7.1. Cultivo celular.....	48
4.2.7.2. Shell Vial.....	49
5. RESULTADOS.....	50
6. DISCUSIÓN.....	53
7. CONCLUSIONES.....	56
8. RECOMENDACIONES.....	57

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
10. ANEXOS.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Total de mosquitos colectados para el estudio de Transmisión Transovárica.....	50
Tabla 2. Total de mosquitos colectados de acuerdo a la metodología utilizada.....	51
Tabla 3 . Lista general de mosquitos utilizados en este trabajo resaltando el origen y la técnica por la que fueron colectados.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la estructura de la estructura del virus del dengue.....	7
Figura 2. Conversión de ARN en ADN.....	14
Figura 3. Secuenciación de ADN.	14
Figura 4. Proceso del PCR en el termociclador.....	14
Figura 5. Huevos de <i>Aedes aegypti</i>	19
Figura 6. Los cuatro estadios de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	21
Figura 7. Pupa de <i>Aedes aegypti</i>	22
Figura 8. Mosquitos en estado adulto.....	23
Figura 9. Criaderos más comunes de <i>Aedes aegypti</i>	27
Figura 10. Ovitrapas y paletas	38
Figura 11. Papeles filtros con huevos de mosquitos.....	38
Figura 12. Separando larvas de diferentes estadios.....	40
Figura 13. Pupas de mosquitos listas para llevar a las jaulas.....	40
Figura 14. Jaulas para los mosquitos adultos.....	41
Figura 15. Mosquitos emergiendo en jaulas.....	41
Figura 16. Bandejas con larvas de <i>Aedes aegypti</i>	43
Figura 17. Aspirador de mosquitos.....	44
Figura 18. Triturando mosquitos para hacerles extracción.....	45
Figura 19. Procesando muestras en el termociclador.....	46
Figura 20. Mapa de la ciudad de Santa Cruz de la Sierra con los 100 puntos elegidos al azar.....	67
Figura 21. Larva de <i>Aedes aegypti</i>	79
Figura 22. Resultados corridos en geles de agarosa de todas las muestras sospechosas para confirmar las positivas.....	75
Figura 19. Jaulas con mosquitos adultos.....	81
Figura 20. Alimentando adultos con ratones de laboratorio.....	81
Figura 21. Alimentando mosquitos hembras.....	81
Figura 22. Alimentando larvas de diferentes estadios.....	

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Mapa de la ciudad de Santa Cruz de la Sierra con los 100 puntos elegidos al azar.....	67
Anexo 2. Test de Mnatel-Haenszel.....	68
Anexo 3. Clave taxonómica para identificar larva y adulto de <i>Aedes aegypti</i>	69
Anexo 4. Protocolo para la extracción del virus del dengue.....	70
Anexo 5. RT-PCR (Reverso Transcripción- Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	72
Anexo 6. Heminested PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	73
Anexo 7. Resultados corridos en geles de agarosa de todas las muestras sospechosas para confirmar las positivas.	75
Anexo 8. Protocolo de inoculación.....	76
Anexo 9. Protocolo del Shell Vial.....	77
Anexo 10. Lista general de mosquitos utilizados en este trabajo resaltando el origen y la técnica por la que fueron colectados.....	79
Anexo 11. Alimentación de los mosquitos <i>Aedes aegypti</i> en sus diferentes estadios.....	81

RESUMEN

Con el trabajo que aquí se presenta se ha querido aportar de alguna manera a la lucha para contrarrestar el dengue en nuestro país y especialmente en nuestro departamento de Santa Cruz; es por ello que el objetivo principal de este trabajo fue comprobar si en poblaciones de mosquitos colectados en la epidemia de (febrero-marzo-abril y mayo) de 2007 en la ciudad de Santa Cruz de la Sierra existe transmisión transovárica, a través de RT-PCR (Reverso Transcripción- Reacción en Cadena de la Polimerasa). Siguiendo nuestro objetivo principal se colectaron 1404 mosquitos, 656 machos y 748 hembras, todos estos fueron separados en lotes de hasta 15 mosquitos y posteriormente procesados para hacerles primeramente un PCR y luego un RT-PCR para detectar el virus en su material genético.

Los resultados de esta investigación fueron positivos, el porcentaje de transmisión transovárica en este estudio es de 0,01%. Es decir de 100 lotes de mosquitos, 14 resultaron positivos para el virus del dengue (5 lotes para dengue-1 9 lotes para dengue-3). De los 14 lotes positivos 11 lotes fueron mosquitos machos y 3 lotes fueron hembras, lo que significa que hubo mas infección en el caso de los machos y como ya sabemos que los mosquitos machos no pican eso se interpreta como infección transovárica a través de la madre.

Con este trabajo se ha demostrado que aquí en la ciudad de Santa Cruz en la epidemia de dengue de 2007 no solo los mosquitos se infectaron en el ciclo que ya conocemos vector-hombre-vector sino que también pueden adquirir el virus a través de la madre infectada, un dato muy importante para tener en cuenta en la lucha antivectorial en nuestro país.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición e historia del dengue

El dengue es una enfermedad infecciosa causada por uno de los cuatro serotipos del virus del dengue (Dengue-1, Dengue-2, Dengue-3 y Dengue-4) los cuales son arbovirus de la familia flaviviridae cuya transmisión al hombre ocurre por la picadura de mosquitos hematófagos del género *Aedes*.

El término “dengue” se originó en América entre 1827 y 1828, a raíz de una epidemia en el Caribe que cursaba con fiebre, artralgias y exantema. Los esclavos provenientes de África identificaron a esta entidad patológica como dinga o dyenga, homónimo del swahili “Ki denga pepo” que significa ataque repentino (calambre o estremecimiento) provocado por un “espíritu malo”. Sin embargo el reporte más antiguo de esta enfermedad, data de la Enciclopedia China de Síntomas de las Enfermedades y Remedios, publicada por primera vez durante la Dinastía Chin (265-420 D.C.). Esta enfermedad fue llamada por los chinos como “agua venenosa” y ellos pensaban que de algún modo estaba relacionada con insectos voladores asociados al agua. (Maguiña *et al.*, 2005).

Hay reportes clínicos de dengue entre 1779 y 1780, (Cairo y Alexandra, Egipto, Jakarta, Indonesia; 1980, Filadelfia, E.U.A., Madras, India), aunque las primeras epidemias compatibles con dengue clásico en Latinoamérica y el Caribe se dieron en las Antillas Francesas en 1635 y en Panamá en 1699, Así como en Asia y en el Pacífico. (Salvatella, 1996).

En el Caribe las epidemias intervienen durante la segunda guerra mundial, después de esto desde 1946 hasta 1963, ninguna epidemia ha sido registrada, esto como resultado de la consecuencia del Programa de Desarraigo de *Aedes aegypti* (vector de la fiebre amarilla urbana) iniciado por el PAHO, en los años 1940 y 1950.

En 1953 y 1954 en Trinidad se aisló por primera vez el agente causal de tipo Dengue-2 a partir de casos no epidémicos. En ésta época el dengue es hipoendémico en esta región, es evidente que al menos un serotipo estaba circulando, pero es sólo que después de 15 años esta infección se volverá un problema de Salud Pública en las Américas, es así que esta infección fue comprobada por laboratorio en la región del Caribe y Venezuela en los años 1963 y 1964, donde el virus del Dengue-3 fue el serotipo circulante.

Entre los años 1968 y 1969 otra epidemia afectó algunas islas del Caribe, aislándose los serotipos de Dengue-2 y Dengue-3. En 1977 el serotipo Dengue-1 fue introducido en América a través de Jamaica, éste se diseminó por la mayoría de las islas del Caribe causando epidemias y también afectó a algunos países centroamericanos (Bélice, Honduras, El Salvador, Guatemala, México) y Sudamericanos (Colombia, Venezuela, Guyana, Surinam), abarcando incluso a Texas en EEUU. (OPS, 1995).

En la década de 1980 la magnitud del dengue se incrementó, llegando en 1982 al norte de Brasil con los serotipos Dengue-1 y Dengue-4; en 1986 afectó Río de Janeiro con el serotipo Dengue-1, posteriormente se presentaron brotes en Bolivia (1987), Paraguay (1988), Ecuador (1988), y el Perú en 1990 en todas con el serotipo Dengue-1. (OPS, 1995).

El serotipo Dengue-4 fue introducido en 1981 y desde entonces los serotipos de dengue 1, 2 y 4 han sido transmitidos simultáneamente en muchos países de América donde *Aedes aegypti* estaba presente. El serotipo Dengue-3 reaparece desde 1994 en Nicaragua, este serotipo constituye un riesgo importante ya que prototipos de éste han sido asociados con la forma hemorrágica de la enfermedad. (OPS, 1995).

Entre 1987 y 1988 la ciudad de Santa Cruz de la Sierra , Bolivia, sufrió una epidemia de dengue clásico causada por el serotipo de Dengue-1. La Organización Panamericana de Salud menciona un total de 6.843 casos pero, según Gubler, (1992) ; la epidemia afectó a más o menos 20.000 personas. Cabe aclarar que en esa ocasión no se notificaron casos hemorrágicos y que, después de la epidemia, no se reportaron más casos de dengue clásico. A fines de 1994 hubo, sin embargo, un aumento de cuadros febriles sospechosos de dengue, diagnóstico que nunca se pudo confirmar. En respuesta a ello se organizó un sistema de vigilancia y se fortaleció la capacidad de diagnóstico del laboratorio para dengue en el Centro Nacional de Enfermedades Tropicales (CENETROP). A pesar de que había un subregistro, se logró demostrar la existencia de casos de dengue en la ciudad de Santa Cruz de la Sierra y en varias localidades del departamento a partir del mes marzo de 1996. Entre diciembre de 1996 y febrero de 1997, el sistema de vigilancia documentó, además, un aumento del número de casos. Para obtener una estimación confiable de la naturaleza y de la magnitud del problema, en marzo de 1997 se organizó una encuesta seroepidemiológica con el objetivo específico de estimar la tasa de ataque de la infección en los dos a tres meses anteriores, tipificar el virus y determinar la proporción de infecciones sintomáticas. En esta oportunidad se detectaron anticuerpos IgM por medio de ELISA (Ensayo Inmuno Enzimático Absorbente), resultando positivos en adultos un 65% y en niños un 51% a esta prueba. El virus circulante fue identificado como dengue serotipo DEN-2, genotipo de Jamaica. Con los resultados obtenidos se esperaba sensibilizar (y alertar, si fuera necesario) a las autoridades, al personal de salud y a la comunidad, para que tomaran las medidas adecuadas. (Gianella, *et al.*, 1998).

1.2. Sobrevivencia del virus

El dengue es una enfermedad de transmisión vectorial, la fuente de infección y el reservorio vertebrado es el hombre, el virus del dengue persiste en la naturaleza gracias al ciclo de transmisión hombre-*Aedes aegypti*-hombre.

Secundariamente contribuyen otros fenómenos como: La replicación del virus en el tracto genital del vector hace que aquel pueda incorporarse a los huevos y a la progenie (transmisión transovarial) o se puede producir transmisión sexual de machos infectados a hembras. (Vignoli, *et al.*, 2002).

La prioridad en esta investigación es saber si el virus del dengue es capaz de transmitirse transovarialmente en el vector *Aedes aegypti* como está aconteciendo en otros lugares del mundo. De comprobarse la transmisión transovárica el virus no necesitaría reintroducirse para cada epidemia en nuestra ciudad y por ende las epidemias de dengue comenzarían en cualquier lugar con las primeras picaduras de los mosquitos infectados con el virus, todos estos factores tienen un importante impacto epidemiológico en la población.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar y evaluar la existencia del fenómeno de transmisión transovárica del virus del dengue y los diferentes serotipos transmitidos por este fenómeno en poblaciones de *Aedes aegypti* durante la epidemia de 2007 en la ciudad de Santa Cruz de la Sierra.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Demostrar la existencia de la de transmisión transovárica.
- ❖ Evaluar la tasa de transmisión transovárica.
- ❖ Comparar las tasas de transmisión transovárica de machos y hembras y de acuerdo a los tipos de colecta.
- ❖ Determinar los diferentes serotipos del virus del dengue transmitidos por transmisión transovárica.

3. REVISION DE LITERATURA

3.1. Agente etiológico (Virus).

El grupo virus dengue está representado por cuatro serotipos (o subespecies): virus dengue1, virus dengue2, virus dengue 3 y virus dengue 4; los cuales tienen características antigénicas diferentes, además pueden presentar variantes genéticas (genotipos y topotipos) dentro de un mismo serotipo, relacionadas con la virulencia y la procedencia geográfica de la cepa. Se ha descrito una homología de secuencia de aproximadamente 70% entre los diferentes serotipos de dengue 1, 2, y 3. Tanto la presentación clínica de dengue clásico como el dengue hemorrágico y el síndrome de choque por dengue son causados por el virus del dengue. (Cabezas, 2005).

Los cuatro serotipos del dengue son filogenéticamente diferentes y están más relacionados con los flavivirus transmitidos por mosquitos. Aunque se desconoce exactamente su origen, estudios recientes indican que surgieron hace aproximadamente 1000 años a partir de un virus de mono y que su transmisión al hombre ocurrió en el transcurso de los últimos 320 años. Algunas investigaciones sitúan su origen en el continente africano; otros lo colocan en Asia. (Guzman, Garcia & Kouri, 2006).

El virus del dengue es un arbovirus (arbo, acrónimo del inglés arthropod-borne, transportado por artrópodos) y pertenece al género de Flavivirus familia Flaviviridae un grupo de más de 68 agentes virales agrupados por su relación serológica y por la determinación de secuencias genómicas; al menos 30 de éstos virus causan enfermedades en los humanos. (Cabezas, 2005).

La familia Flaviviridae agrupa virus ARN de cadena simple en sentido positivo que se multiplican en células de vertebrados y de insectos vectores. Esta familia está representada por tres géneros: Flavivirus (latín: flavus, amarillo), Pestivirus (latín:

pestitis, peste, plaga) y virus hepatitis C (griego: hepato, hígado; también conocidos como hepatocivirus). El género Flavivirus reúne en su mayoría (55%) a virus asociados con enfermedades humanas y algunos patógenos de animales domésticos o de interés económico. Además consta de más de 70 virus clasificados en diez grupos (o especies), entre ellos el virus del dengue. (Cabezas, 2005).

La partícula viral del dengue es de forma esférica y mide entre 40 y 60 nm. de diámetro. Tiene una envoltura formada por proteínas (proteína E principalmente, y proteína M) que cubre completamente la superficie del virus. El material genético se encuentra protegido por una nucleocápside circular de simetría poliédrica; el diámetro del núcleo es de 25-30 nm. Entre la envoltura y la nucleocápside se encuentra una bicapa lipídica, cuyos lípidos se derivan de la membrana celular del hospedero. El genoma está compuesto por una sola molécula de RNA de cadena sencilla lineal, de sentido positivo, de 10703 nucleótidos y de alta variabilidad genómica. (Cabezas, 2005).

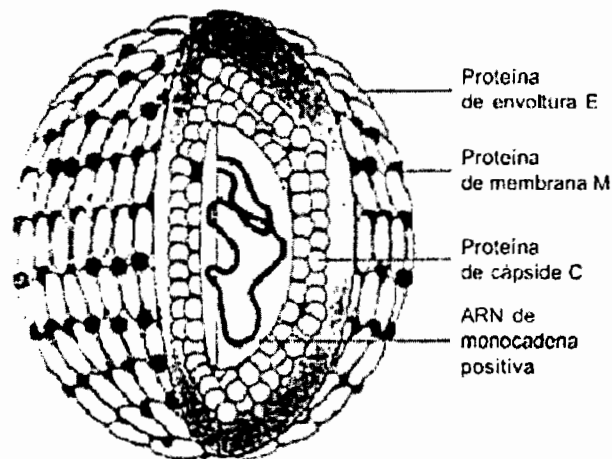


Figura 1. Esquema de la estructura del virus del dengue

El virión es infeccioso y está compuesto por 6% de ARN, 66% de proteínas, 9% de carbohidratos y 17% de lípidos. El genoma tiene una longitud de 9500 a 12500 nucleótidos, y da lugar a tres proteínas estructurales: la proteína E de envoltura, la

proteína M de membrana y la proteína C de cápside y a siete proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5). (Cabezas, 2005).

3.2. Técnicas de aislamiento del virus

Uno de los sistemas biológicos mas empleados en el aislamiento del virus del dengue, a pesar de su baja sensibilidad, ha sido el ratón lactante inoculado por vía intracerebral. También se han utilizado diferentes sistemas celulares de mamíferos entre los que se encuentran las líneas celulares: BSC1, VERO, BHK-21, LLCMK2. (Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico y la Caracterización del Virus del Dengue, 2003).

En las últimas décadas se han desarrollado una serie de líneas de mosquitos que han resultado ser mucho más sensibles a la infección por el virus que con los sistemas anteriores. Dentro de las más utilizadas se encuentran las células: AP-61, C6/36, TRA-284 Y C6/36 HT. La elevada sensibilidad de éstos sistemas, ha permitido alcanzar un alto índice de aislamiento. Actualmente se emplea con éxito la inoculación intratorácica de mosquito. Este método ha demostrado ser el más sensible. (Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico y la Caracterización del Virus del Dengue, 2003).

3.2.1. Células de mamífero

El virus del dengue es capaz de multiplicarse en varias líneas celulares de mamíferos como las células BHK21, KB, VERO, no obstante las más sensibles son las de riñón de mono verde africano LLCMK2, útiles no solo en el aislamiento sino también para la identificación aunque no son menos sensible que las células de mosquitos.

La identificación rápida se hace por IFI (Inmunofluorescencia Indirecta) y la confirmación por reducción del número de placas por neutralización. (Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico y la Caracterización del Virus del Dengue, 2003).

3.2.2. Cultivos celulares de mosquitos

Son las células más sensibles para el aislamiento del dengue y pueden ser utilizadas las C6/36, AP61, TRA-284-SF y C6/36 HT en este orden creciente de sensibilidad. Es de señalar que algunas sublíneas del clono celular C6/36 se han vuelto menos sensibles a los virus del dengue sugiriendo que este sistema celular no es homogéneo y ha revertido apareciendo células menos sensibles. Aún cuando algunas pocas células se infectan, varias cepas no se replican y no favorecen la diseminación al resto de las células lo que influye en la identificación de los virus utilizando anticuerpos monoclonales. Las ventajas de esta línea celular es su facilidad de manipulación y rapidez de crecimiento.

La línea celular AP61 es altamente sensible a los virus del dengue mostrando frecuentemente ECP (Efecto Citopatogénico) de tipo sencital. Aunque algunos autores plantean la dificultad de identificar los aislamientos en estas células utilizando la IFI, dicha técnica es útil si se dispersan bien las células al realizar la suspensión de las mismas. (Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico y la Caracterización del Virus del Dengue, 2003).

La línea celular TRA-284-SF es muy sensible para el aislamiento del dengue. Son fáciles de manipular y muy económicas ya que crecen en medio libre, aunque su velocidad de crecimiento y split no son grandes. Son de mayor tamaño que las C6/36 y el "screening" mediante la IFI es relativamente fácil. (Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico y la Caracterización del Virus del Dengue, 2003).

Recientemente ha comenzado a utilizarse una sublínea del clono C6/36 capaz de multiplicarse a 34 °C. algunos autores plantean que esta sublínea de alta temperatura (C6/36 HT) resiste solo varias semanas de mantenimiento bajo estas condiciones y proponen tomar el clono original de 28 °C y readaptarlo a crecer a 34 °C cada vez que el deterioro provocado por la elevada temperatura lo exija;

entre los investigadores de la región se ha propagado esta sublínea C6/36 HT que ha demostrado mayor eficacia para el aislamiento viral al adelantar la detección por IFI y aumentar el número de aislamientos. (Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico y la Caracterización del Virus del Dengue, 2003).

Como método general se inocular la muestra, se espera de 10 a 14 días (observando la posible aparición de efecto citopatogénico (ECP) y se realiza IFI, primero como "screening" utilizando un "pool" de sueros humanos positivos o líquidos ascíticos hiperinmunes (LAH). En los casos positivos se realiza una IFI utilizando Anticuerpos Monoclonales específicos a los 4 serotipos del dengue. (En ocasiones se presentan dificultades al utilizar estos anticuerpos monoclonales dada la alta especificidad de los mismos, el bajo título viral y el grado de ECP. La confirmación puede realizarse por neutralización por reducción del número de placas previo título del virus aislado. (Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico y la Caracterización del Virus del Dengue, 2003).

3.3. Diagnóstico molecular

En éstos últimos años varias técnicas de diagnóstico molecular se han desarrollado y se ha aprobado su utilidad para el diagnóstico del dengue. Éstos métodos pueden detectar fácilmente los virus del dengue principalmente durante la fase aguda de la enfermedad. Entre ellas tenemos las siguientes:

3.3.1. Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia (IF) o Técnica de Anticuerpos Fluorescentes se basa en la unión inmunológica de un anticuerpo marcado con un fluorocromo a su antígeno homólogo.

Se considera un fluorocromo a una sustancia que al ser excitada por una onda luminosa, es capaz de emitir luz de menor energía (mayor longitud de onda) que la de la onda que provoca la excitación. El fluorocromo de más amplia aplicación en

esta técnica es el isotiocianato de fluoresceína. (Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico y la Caracterización del Virus del Dengue, 2003).

En 1941 la IF fue introducida por Coons, et *al.*, quienes emplearon el isocianato de fluoresceína para marcar tanto antígenos como anticuerpos.

Posteriormente, las técnicas de conjugación fueron modificadas por Ringgs y colaboradores. Estos investigadores reemplazaron el radical isocianato por el isotiocianato, este último más estable, mas fácil de conjugar y de obtener comercialmente. (Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico y la Caracterización del Virus del Dengue, 2003).

A partir de los años 50, la IF ha sido ampliamente utilizada para la identificación de parásitos, bacterias y numerosos virus, así como la detección de anticuerpos para éstos agentes. (Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico y la Caracterización del Virus del Dengue, 2003).

3.3.1.1. Principio de la técnica

Las moléculas proteicas de los anticuerpos se unen al marcador fluorescente (fluorocromo) por medio de firmes enlaces químicos. Como la actividad inmunológica de estos anticuerpos no se altera, la capacidad de los mismos de unirse a los antígenos homólogos permanece íntegra.

Debido a la alta especificidad de la reacción Ag-Ac, la IF se ha convertido en un método muy útil para el diagnóstico. Otra de sus ventajas es el tiempo relativamente corto que se requiere para el procesamiento de la muestra hasta llegar al resultado final.

La IF es aplicable a cualquier sustancia antigénica que se localice dentro o fuera de las células, sean antígenos protozoarios, bacterias, rickettsias, virus, hormonas,

enzimas, antígenos tisulares y otros. La extensa variedad de estructuras y propiedades físico-químicas de los antígenos implica que sus requerimientos para ser marcados con el fluorocromo variarán para cada caso en específico, de ahí que se haya generalizado el procedimiento de marcar los anticuerpos (todos los anticuerpos son proteínas). Por ello, la IF se conoce también con el nombre de Técnica de Anticuerpos Fluorescentes.

3.3.2. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). El gran éxito obtenido por Kary Mullis (1986), consistió en lograr in vitro un gran número de copias de fragmentos específicos de ADN, basándose en un principio muy sencillo: la utilización de mecanismos similares a los empleados por la propia célula en la replicación del ADN durante la división celular. (Salas & Arenas, 2001).

La introducción de esta técnica es sin duda la revolución tecnológica mas reciente de la biología molecular. El poder de esta técnica reside en la capacidad de reproducir cantidades en la práctica ilimitadas de un fragmento de ADN particular, a partir de hasta única copia del mismo y en una única reacción. Mediante la PCR es posible generar moléculas de ADN en cantidades que permitan su caracterización a partir de muy poco material inicial (un pelo, células descamadas de la piel, etc.) lo que permite un muestreo no invasivo de restos. Sus principales aplicaciones son tres:

Microsatélites. La visualización de los fragmentos amplificados tras electroforesis puede ser en si misma informativa cuando a partir de distintos genotipos se obtienen patrones de bandas diferentes. (Jordano, 2000).

Los microsatélites son otro tipo de loci VNTR en los que la secuencia repetida es de solo 2-4 pares de bases. La amplificación de estos loci mediante PCR son cebadores flanqueantes la repetición genera fragmentos cuyo tamaño depende del número de repeticiones de esta secuencia, caracterizándose así fácil y

sensiblemente los alelos de éstos locis en un número considerable de individuos. Tanto la simpleza tecnológica (de la aplicación, no tanto del desarrollo) como la cantidad y calidad de la información que genera (hipervariabilidad, análisis locus a locus) han convertido al análisis de microsatélites en una de las técnicas más poderosas para la identificación de individuos, los análisis de parentesco y la genética de poblaciones. (Jordano, 2000).

Los RAPD: (Randomly Amplified Polimorphic ADN). En esta aplicación ingeniosa de la PCR el ADN total de un organismo cebado con oligonucleótidos cortos de secuencia arbitraria que ceban al azar en numerosos sitios esparcidos por el genoma. De cada reacción se obtiene así un patrón de segmentos que es específico del genoma analizado y del cebador utilizado. La comparación y análisis de los patrones de bandas entre individuos permite la estimación de variabilidad genética en poblaciones.

Secuenciación de ADN: Las técnicas de secuenciación de ADN han estado disponibles desde 1977. Sin embargo, su aplicación a estudios poblacionales ha estado limitada por la dificultad en la producción de cantidades suficientes del ADN a secuenciar. La introducción de la PCR salvó esta dificultad y actualmente resulta viable la secuenciación de fragmentos de ADN de un número considerable de individuos, mucho más si se dispone de secuenciadores automáticos. Para este objetivo, la PCR simplemente proporciona cantidades suficientes de ADN molde de cada individuo. (Jordano, 2000).

El ácido desoxirribonucleico o ADN es la muestra para iniciar el PCR, por ello las bacterias y virus ADN pueden ser utilizadas directamente para la prueba. En caso del material genético conformado por ARN se debe sintetizar en ADN, utilizando una enzima conocida como retrotranscriptasa inversa, con ella se crea un ADNc (ácido desoxirribonucleico complementario), para poder utilizar así una secuencia blanco adecuada para la prueba. (Figura 2).

DETERMINACIÓN DE LA EXISTENCIA DEL FENÓMENO DE TRANSMISIÓN TRANSOVÁRICA EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) DURANTE LA EPIDEMIA DE DENGUE 2007 EN LA CIUDAD DE SANTA CRUZ DE LA SIERRA - BOLIVIA.. Cruz Zambrana Mirian

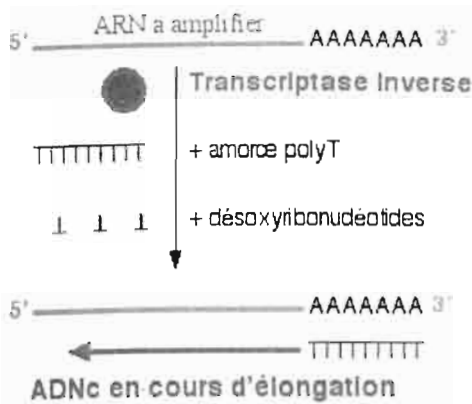


Figura 2. Conversión de ARN en ADN

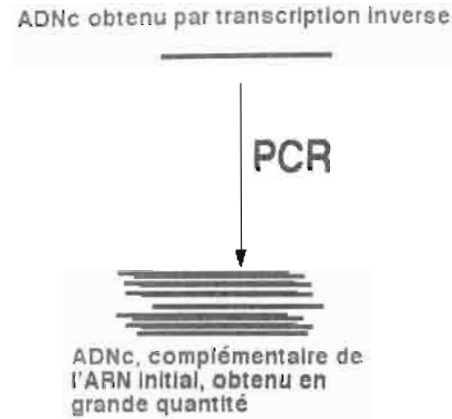


Figura 3. Secuenciación de ADN

La PCR se divide en tres etapas básicas: desnaturalización, alineación y elongación. (Figura 4).

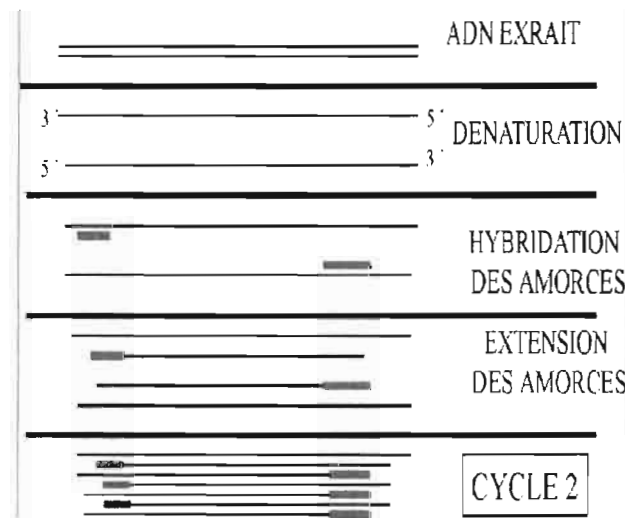


Figura 4. Proceso del PCR en el termociclador.

Desnaturalización: Esta se produce cuando el ADN es calentado a 95 °C, lo que causa que se de una separación de la doble hélice del ADN, creando dos bandas sencillas de ADN. (Lara *et al.*, 2006).

Alineación: La temperatura se reduce alrededor de los 50 °C permitiendo que los indicadores o primers diseñados, que son secuencias del material genético blanco diseñadas para acoplarse, se unan a una región específica de ácido nucleico de banda sencilla que queremos identificar (esta unión es la que da una alta especificidad a la prueba). Normalmente tiene 20 bases o nucleótidos de longitud. (Lara *et al.*, 2006).

Elongación o prolongación: en esta fase la secuencia blanco y los indicadores en conjunto con los nucleótidos libres (dNTP's) y la Taq Polimerasa son sometidos a una temperatura de 72 °C con ello los nucleótidos libres se acoplan a las secuencias específicas que marca el iniciador y son pegados por la acción de la Taq Polimerasa, para formar así una molécula de ADN de dos bandas.

Los tres pasos anteriores corresponden a lo que se llama un ciclo de amplificación. Estas tres fases son repetidas, una y otra vez en un termociclador, para amplificar el ADN. Después de 39 ciclos (2 horas), la banda inicial de ADN exponencialmente, produciendo así $2^{39} = 5497558139 \times 10^{11}$ moléculas idénticas (producto del PCR) del ADN original a partir de una sola molécula del ADN. Esta amplificación exponencial es la que da sensibilidad a la prueba. (Lara *et al.*, 2006).

3.3.3. RT-PCR (Retrotranscriptasa/ Reacción en cadena de Polimerasa). Es una técnica con 100% de sensibilidad y además es muy específica comparado con los ensayos de ELISA (Ensayo Inmuno Enzimático Absorbente) dan reacciones cruzadas con los diferentes subgrupos de este género de virus. (Cáceres, 2003).

Esta técnica se ha desarrollado para el diagnóstico de varias enfermedades y en los últimos años ha evolucionado hacia el diagnóstico laboratorial de enfermedades infecciosas, este método es rápido, sencillo, simple y si está

estandarizado correctamente, puede ser usado para la detección del genoma en las muestras clínicas humanas, los tejidos de autopsias y de mosquitos. (Cabezas, 2005).

Dicha técnica sirve para sintetizar ADN a partir de ARN y posteriormente duplicar ese ADN en millones de copias. La razón para convertir el ARN en ADN, es debido a que el ARN es altamente sensible a las temperaturas y a un sin número de sustancias que lo desnaturalizan. Por el contrario el ADN el cual es muy estable y mas sencillo de conservar y manejar (Lara *et al.*, 2006). (Figura 1).

Esta prueba permite la identificación de los serotipos en muestra de sueros de sobrenadantes de células infectadas con muestras clínicas. El RT-PCR es útil para obtener información rápida de los serotipos circulantes del dengue, sin embargo es muy importante aislar el virus para confirmar su identidad y realizar estudios más detallados (Mamani *et al.*, 2005).

3.3.3.1. Electroforesis

Posteriormente para valorar el producto del PCR es necesario realizar la técnica de electroforesis en un gel de agarosa; con el objeto de realizar un ordenamiento por tamaño de los fragmentos de ADN amplificados por el PCR. Con una corriente eléctrica que es transmitida a través del gel agarosa. Se logra ordenar en donde los fragmentos de menor tamaño se distribuyen más rápido que los de mayor tamaño. (Lara *et al.*, 2006).

En el gel de agarosa existen diferentes "carriles" de corrimiento. En forma normal se utiliza uno de estos carriles de los extremos para colocar un control marcador de pares de bases conocido, normalmente de 0 a 600 pares de bases (bp), con incrementos de 100 bp, seguido se coloca un control positivo, ambos productos del PCR y en los carriles restantes se coloca el producto del PCR obtenido de las muestras problema. Al aplicar la corriente eléctrica los fragmentos de ADN tienden

a migrar. Posteriormente el gel es teñido con Bromuro de Etidio (o algún colorante fluorescente) que solo se adhiere al ADN presente en la agarosa del gel. El gel es visualizado con una lámpara de luz ultravioleta y se escanea o se fotografía para dejar una evidencia física del corrimiento electroforético. Con la fotografía o imagen escaneada del gel se determina el tamaño de los fragmentos amplificados del producto del PCR comparándolo contra el control de pares de bases y el control positivo. (Lara *et al.*, 2006).

3.4. Vectores

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762), es un mosquito cuyo origen se ubica en la región etiópica, que agrupa la mayor cantidad de especies del subgénero *Stegomyia* Theobald, 1901, al cual pertenece este culicido, allí este mosquito es una especie silvestre, habitando libre del contacto con el hombre. Ancestralmente, desde esas áreas, inició una dispersión efectuada por el hombre, que lo ha llevado a constituirse en un mosquito cosmopolita. Su presencia es o fue detectada en la mayor parte de las áreas tropicales o subtropicales, comprendidas entre los 45° de latitud norte y los 35° de latitud sur, en las zonas isotermales intermedias a los 20°C. Es un efectivo vector de diversas arbovirosis, pero su mayor importancia epidemiológica esta ligada a su papel como transmisor de fiebre amarilla y, con mayor actualidad, de dengue. *Aedes albopictus* Skuse, 1894, Es otra especie del subgénero *Stegomyia*, que ha sido introducida recientemente en América, cuyo origen es Asia y Oceanía, donde ancestralmente protagoniza la transmisión de dengue. (Salavatella, 1996).

Desde 1980 hasta 1996, se asiste a una constante dispersión y reinfestación de diversas áreas de las Américas con *Aedes aegypti*. Este hecho ha motivado más frecuentes e importantes epidemias de dengue en Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú, Venezuela, México, toda Centroamérica Antillas y Estados Unidos, entre otros países. (OPS, 1995).

3.4.1. Taxonomía del Vector

Aedes aegypti: Linnaeus, 1762

Reino: Animalia

Phyllum: Artropoda

Clase: Insecta

Orden: Díptera

Familia: Culicidae

Subfamilia: Culicinae

Género: *Aedes*

Subgénero: *Stegomyia*

Especie: *Aedes aegypti*

(Rodríguez & Marzal, 2004).

El *Aedes aegypti* tiene su origen en el continente africano. Se conocen tres variedades principales: *Aedes aegypti* var. *aegypti*; *Aedes aegypti* var. *formosus*, y *Aedes aegypti* var. *queenslandensis*. La variante *aegypti* es la más distribuida en el mundo; se conoce que la var. *queenslandensis* es parecida a la *aegypti* en casi todos los aspectos. La var. *formosus* está confinada a ciertas regiones africanas y difiere en su taxonomía y biología selvática. (BADII, M. H., et al. 2007).

3.4.2. Biología de *Aedes aegypti*

El ciclo completo de *Aedes aegypti*, de huevo a adulto, se completa en óptimas condiciones de temperatura y alimentación, en 10 días aproximadamente. Los mosquitos se desenvuelven a través de metamorfosis completa, El ciclo de vida de *Aedes aegypti* comprende cuatro fases: huevo, larva (cuatro estadios larvales), pupa y adulto. (Hernández, 2005).

3.4.2.1. Huevo

Los huevos de *Aedes aegypti* miden, aproximadamente 1 mm. de longitud y de contorno alargado y fusiforme (Figura 5). Son depositados por la hembra individualmente, en las paredes internas de depósitos que sirven como criaderos, próximos a superficies de agua. En el momento de la postura los huevos son blancos, mas rápidamente, adquieren color negro brillante. (FUNASA, 2001). Por lo regular, la hembra del *Ae. aegypti* deposita huevecillos en las paredes húmedas de los recipientes de agua. Existe preferencia a ciertos tipos de recipientes, dependiendo de su oxigenación, temperatura, humedad, color, olor, contenido de materia orgánica, capacidad y estabilidad del agua, aunque esto no es limitante para encontrar una gran diversidad de criaderos. (BADII, M. H., *et al.* 2007).



Figura 5. Huevos de *Aedes aegypti*

La fecundación se da durante la postura y el desenvolvimiento del embrión se completa en 48 horas en condiciones favorables de humedad y temperatura. Una vez completado el desenvolvimiento embrionario, los huevos son capaces de resistir largos períodos de disecación que pueden prolongarse por más de un año. (FUNASA, 2001).

La capacidad de resistencia de los huevos de *Aedes aegypti* ha desencadenado un serio problema u obstáculo para su erradicación. Esta condición permite que

los huevos sean transportados a grandes distancias, en recipientes secos, tornándose así el principal medio de dispersión del insecto (dispersión pasiva). (Hernández, 2005).

La hembra ovipone en tandas de 150 a 700 huevos promedio por cada una, repartiéndose los mismos en varios recipientes y siendo capaz de oviponer por lo menos 4 veces en su ciclo de vida. (Ministerio de Desarrollo Humano, 2004).

3.4.2.2. Larvas

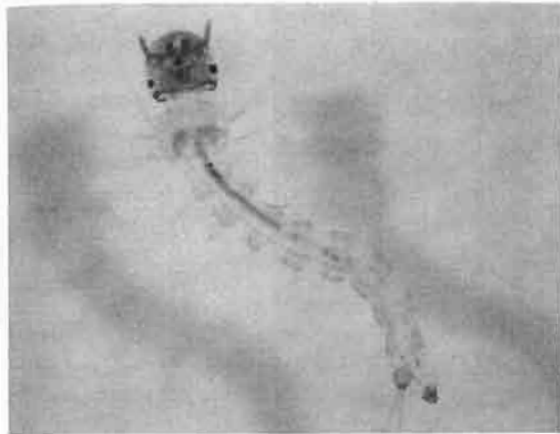
Como el *Aedes aegypti* es un insecto holometábolo, la fase larvaria es período de alimentación y crecimiento. Las larvas pasan la mayor parte del tiempo alimentándose principalmente de material orgánico acumulado en las paredes y fondos de los depósitos. Las larvas poseen cuatro estadios evolutivos. La duración de la fase larvaria depende de la temperatura, disponibilidad de alimento y de la densidad de larvas en los criaderos. En condiciones, óptimas el período entre la eclosión y la pupación puede no exceder a 5 días. (FUNASA, 2001).

Con todo, en bajas temperaturas y escasez de alimento, los cuatro estadios larvales pueden prolongarse por varias semanas, antes de su transformación en pupa. (Hernández, 2005).

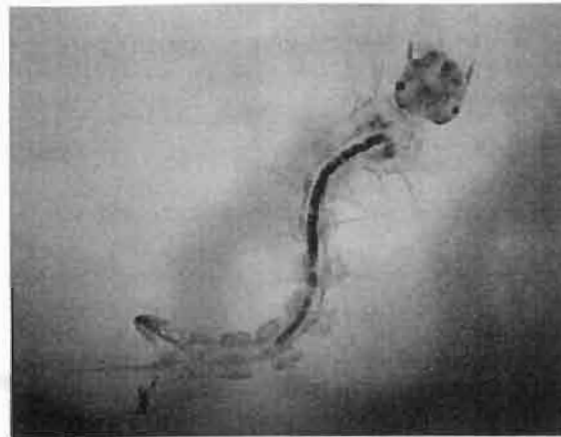
Las condiciones favorables para el desarrollo larvario es de 25 a 29°C. Las larvas son incapaces de resistir temperaturas inferiores a 10°C, superiores a 44 o 46°C, impidiéndose a menos de 13°C su pasaje a estado pupal. (Salvatella, 1996).

Una larva de *Aedes aegypti* está compuesta de cabeza, tórax y abdomen. El abdomen está dividido en diez segmentos. El segmento posterior y anal del abdomen tiene cuatro branquias lobuladas para la regulación osmótica y un sifón como tubo de aire para la respiración en la superficie del agua. El sifón es corto,

grueso y más oscuro que el cuerpo. Para respirar la larva sube a la superficie, donde queda en posición casi vertical. Se mueve en forma de serpiente, haciendo una "S", en su desplazamiento. (Figura 6). Es sensible a movimientos bruscos bajo el agua; y la luz lo hace desplazarse con rapidez buscando refugio en el fondo del recipiente (fotofobia). (FUNASA, 2001).



Larva de 1º estadio



Larva de 2º estadio



Larva de 3º estadio



Larva de 4º estadio

Figura 6. Los cuatro estadios de larvas de *Aedes aegypti*

Con la luz las larvas se desplazan hacia el fondo. Se debe tener en cuenta su mayor vulnerabilidad en esta fase, (Hernández, 2005).

3.4.2.3. Pupa

Las pupas no se alimentan, en esta fase ocurre una metamorfosis de estadio larval para el adulto. Cuando inactivas se mantienen en la superficie del agua flotando, facilitan la emergencia del insecto adulto. El estado pupal dura generalmente de dos a tres días. (FUNASA, 2001).



Figura 7. Pupa de *Aedes aegypti*

Las pupas son divididas en cefalotórax y abdomen, la cabeza y el tórax están unidos, constituyendo una porción llamada cefalotórax y, que una pupa vista de lado tiene la apariencia de una coma. La pupa tiene un par de tubos respiratorios como "trompetas" que atraviesan el agua y permiten la respiración. (Hernández, 2005). (Figura 7).

3.4.2.4. Adulto

La fase aérea (adultos) del *Aedes aegypti*, la cual inicia cuando éste emerge de la última fase acuática (pupa), es relativamente fácil de reconocer debido a los colores y formas que los caracterizan: mosquitos negros con escamas de color plateado en el tórax y apéndices locomotores. (BADII, M. H., *et al.*, 2007).

Las escamas de la región dorsal del tórax (mesonoto), dan la apariencia de una lira. Las hembras del *Ae. aegypti* presentan antenas con pelos cortos y escasos, los palpos son de un tercio o menos de longitud que la proboscis. En cambio, en los machos las antenas son plumosas con pelos largos y abundantes y los palpos son del tamaño de la proboscis. (Figura 8). Las hembras de estos vectores son hematófagas y desarrollan su ciclo biológico donde habita el hombre, son antropofílicas y antropofágicas; los machos se alimentan de néctares de plantas que se encuentran a su alrededor y frecuentemente están cercanos a las fuentes de alimentación de las hembras para realizar el apareamiento (PAHO, 2000a).



Aedes aegypti (macho).



Aedes aegypti (hembra).

Figura 8. Mosquitos en estado adulto

El adulto de *Aedes aegypti* representa una fase reproductora del insecto, como ocurre con gran parte de los insectos alados. El adulto representa la fase activa de la dispersión, pero esta dispersión está limitada ciertamente en el espacio a unos cientos de metros alrededor de su criadero larval. En cambio, el estadio de los huevos y de las larvas es la fase pasiva de la dispersión pero representa la fase más importante de la dispersión. Luego de emerger del estado pupal, el insecto adulto procura posar sobre las paredes del recipiente, así permanece durante

varias horas, lo que permite el endurecimiento de su exoesqueleto, de las alas y, en el caso de los machos, la rotación de la genitalia en 180°. (FUNASA, 2001).

3.4.3. Ecología del adulto

En la ecología de *Aedes aegypti* podemos mencionar las siguientes etapas:

3.4.3.1. Emergencia. Luego de emerger de la pupa, el insecto se posa sobre las paredes del recipiente durante varias horas hasta el endurecimiento de sus alas y su exoesqueleto. (Cabezas, 2005).

3.4.3.2. Apareamiento. Dentro de las 24 horas, después de la emergencia, puede ocurrir apareamiento. (Cabezas, 2005). Generalmente el apareamiento se realiza cuando la hembra busca alimentarse; se ha observado que el ruido que emite al volar es un mecanismo por el cual el macho es atraído. Una vez copulada e inseminada la hembra, el espermatozoos que lleva es suficiente para fecundar todos los huevecillos que produce durante su existencia, no aceptando otra inseminación. (BADII, M. H., *et al.*, 2007).

3.4.3.3. Alimentación. Las hembras se alimentan de la mayoría de vertebrados, pero prefieren a los humanos, vuelan en sentido contrario al viento y son atraídas por los olores y gases del hombre. La sangre sirve para el desarrollo de los huevos. (Cabezas, 2005).

La actividad de picadura es durante periodos de baja intensidad de la luz solar; en general, se inicia al amanecer (6:00 a 8:00 hrs.) y antes del anochecer (17:00 a 19:00 hrs.). Las curvas de actividad alimenticia muestran que hay dos periodos de mayor actividad, más durante el alba que por las noches. Sin embargo, la alimentación puede estar condicionada a la posibilidad de obtener sangre de los habitantes de las casas, pudiendo modificar su actividad y picar a cualquier hora.

La etapa adulta es una fase en la vida del insecto especializada en la alimentación, reproducción y dispersión. (PAHO, 2000a).

A diferencia de otras especies de mosquitos, el *Aedes aegypti*, se alimenta más de una vez entre cada ovipostura, especialmente si se le perturba; esta particularidad aumenta las probabilidades de que ingiera y transmita el virus. El intervalo entre la ingestión de sangre y la ovipostura puede ser de sólo 3 días, en condiciones óptimas de temperatura y disponibilidad de huéspedes. La hembra puede volver a alimentarse el mismo día de la ovipostura. (BADII, M. H., *et al.*, 2007).

3.4.3.4. Ciclo gonadotrófico. Después de cada alimentación se desarrolla un lote de huevos. Si la hembra completa su alimentación sanguínea (2-3 mg) desarrollará y pondrá 100-200 huevos, el intervalo dura de dos a tres días. La hembra grávida buscará recipientes oscuros o sombreados para depositar sus huevos, prefiriendo aguas limpias y claras. (Cabezas, 2005).

3.4.3.5. Rango de vuelo. Se ha medido la distancia del desplazamiento de vuelo de los mosquitos entre las casas; la hembra de *Ae. aegypti* puede volar en un radio promedio de 40 a 60 metros. Si no hay recipientes, una hembra grávida puede volar 3 kilómetros para poner sus huevos. Los machos se dispersan menos que las hembras. (Cabezas, 2005).

La distancia se halla influida, entre otras circunstancias, por la cercanía de criaderos preferidos, la accesibilidad para alimentarse y por los lugares de reposo. El viento ocasionalmente los desplaza más lejos y también pueden ser trasladados en vehículos terrestres (ferrocarril, autobuses, llantas usadas), marítimos o aéreos a mayores distancias. Durante la época de lluvias, las densidades se incrementan como consecuencia de la disponibilidad de un número mayor de criaderos. Sin embargo, esto no debe tomarse como un parámetro definitivo. El almacenamiento de agua, sea por circunstancias culturales, por deficiencias en la red del suministro

de agua o porque se carece de este último, favorece el incremento de las densidades de mosquitos *Aedes* y el desarrollo de epidemias de dengue, aun cuando el factor de la lluvia no esté presente (PAHO, 2000b).

3.4.3.6. Conducta de reposo. Descansan en lugares sombreados como alcobas, baños, patios o cocinas; cerca de las habitaciones humanas o en la peri domicilio, posado en lugares oscuros y protegidos, relativamente cerca del suelo. (BADII, M. H., *et al.* 2007). Se les captura sobre ropas colgadas, debajo de muebles, toallas, cortinas y mosquiteros. (Cabezas, 2005).

3.4.3.7. Longevidad. Los adultos pueden permanecer vivos en el laboratorio durante meses y en la naturaleza pocas semanas. Con una mortalidad diaria de 10%, la mitad de los mosquitos morirán durante la primera semana y 95% en el primer mes. (Cabezas, 2005). El periodo de vida del mosquito adulto se ve afectada por las características climáticas, principalmente la humedad y la temperatura, pues condicionan sus actividades de alimentación, reproducción y reposo. A una temperatura inferior a 4°C o superior a los 40 °C generalmente no sobreviven. El *Aedes aegypti* en condiciones naturales sobrevive en promedio de 15 a 30 días, alimentándose aproximadamente cada tres días. La variación de temperatura y humedad, así como la latitud pueden hacer variar estos rangos del ciclo de vida de las cepas de mosquitos. (PAHO, 2000b).

3.4.3.8. Criaderos. Los cuerpos de agua donde se desarrolla la fase acuática del *Aedes aegypti* son comúnmente llamados criaderos. En su mayoría son de tipo artificial, producidos por el hombre y ubicados dentro o cerca de las casas. En forma potencial, todo recipiente capaz de contener agua y ante la presencia del mosquito puede transformarse en criadero. Las características de los criaderos condicionan la presencia permanente o temporal de los mosquitos. El tamaño de los criaderos puede variar, desde la tapa de un envase de refresco, hasta una cisterna; pueden ser artificiales (plástico, metal, madera y cemento) o

naturales (como son las axilas de los árboles, plantas o pequeños encharcamientos). La disponibilidad de agua es muy importante para aumentar la probabilidad de que los recipientes puedan convertirse en criaderos de mosquitos. Los almacenes de agua de uso doméstico (tinacos, pilas, tambos, bebederos de animales o floreros) los almacenes temporales, tales como llantas de vehículos y demás recipientes que pueden convertirse en contenedores de agua de manera accidental o natural (por efecto de la lluvia, inundaciones) pueden convertirse en criaderos. Los criaderos pueden estar dentro o alrededor de las casas, debido entre otras causas, a la variación en la cantidad de mosquitos y los cambios climáticos. (PAHO, 2000b). (Fig. 9).



Figura 9. Criaderos más comunes de *Aedes aegypti*.

3.5. Historia de la transmisión transovárica

A mediados del siglo XIX, Louis Pasteur propone el concepto de la transmisión de un agente infeccioso de una generación de insecto a otro, demostrando que el agente del pebrine, enfermedad de los gusanos de seda, está presente en los

huevos. Se conoce también la importancia de los trabajos de Finlay en el descubrimiento, desde 1881, del papel jugado por el mosquito en la transmisión inter-humana de la fiebre amarilla; en cambio, se desconoce la hipótesis emitida en 1898, de la transmisión transovárica del "virus" (virus amaril que fuera descubierto sólo en 1927) en el mosquito.

Algunos años más tarde, Marchoux & Simond (1906), enviados a Río de Janeiro, hacen estudios de la transmisión hereditaria del virus de la fiebre amarilla en *Aedes aegypti*. Durante largos años, su observación no pudo ser reproducida porque la tasa que tenían de referencia de otra parte era muy baja y fue considerada como error hasta el comienzo de los años 1970.

Los trabajos de Robert Tesh (1972), demuestra la transmisión transovarial del virus de la estomatitis vesicular por los flebótomos (*Lutzomyia*) confirmaron las búsquedas sobre esta hipótesis que finalmente habían aportado mucho. En 1976, Jean Coz y sus colaboradores demostraron en Dakar la realidad de la transmisión transovárica del virus Koutango, Flavivirus parecido de éste de la fiebre amarilla, en *Aedes aegypti*. La puesta al punto de este modelo experimental permitió la persecución buscando en los virus una mayor importancia en medicina humana.

En 1979, Aitken ha realizado esta transmisión transovárica del virus amaril infectando a los *Aedes aegypti* por la vía intratorácica. En la misma época (1985), Rosen llega a reproducirla y a demostrarla luego la transmisión ovárica del virus de la encefalitis japonesa de los virus del dengue.

3.5.1. Transmisión transovárica en mosquitos

Un estudio de Rosen (1987), demostró que los mosquitos machos de *Ae. albopictus* fueron infectados por los virus de Dengue-1, 2, 3, y 4 a través de las hembras por transmisión vertical y a su vez estos machos también infectaron a las hembras las cuales colocaron huevos también infectados con dichos virus.

En 1988, Rosen, observó en un estudio el mecanismo de transmisión vertical en *Ae. albopictus* con los virus de la Encefalitis Japonesa, el virus de San Louis y el virus de dengue-1.

Se ha demostrado que existe transmisión vertical en una serie de mosquitos que transmiten virus. Por ejemplo una investigación en el Brasil demostró que infectando a hembras de *Ae. albopictus* con virus de dengue-1 y dengue-4 pudieron transmitir el virus a su primera generación, tanto a hembras como a machos. (Mitchell & Miller, 1990).

Bosio *et al*, (1992). Realizó un estudio con hembras de *Ae. albopictus* infectando a estos con una cepa de Jamaica del serotipo dengue-1 donde comprobó también la transmisión vertical.

3.5.2. Transmisión transovárica en *Aedes aegypti*

Después de haberse demostrado la transmisión transovarial en una serie de mosquitos también se han hecho estudios en *Aedes aegypti* por ejemplo en el 2008, Bennet y Joshi, demostraron es un estudio comparativo en la India que *Ae. Albopictus* es el que presenta mayor porcentaje de transmisión vertical, seguido por *Aedes Aegypti* y por último *Aedes vittatus*. Esto haciendo una comparación de todas las estaciones del año, pero cabe resaltar que también es este estudio se demostró que *Aedes aegypti* tuvo mayor porcentaje de transmisión vertical en la época de verano y lluviosa.

Otro estudio ha demostrado que el virus dengue-3 es capaz de pasar hasta la séptima generación a través de transmisión transovarial, claro que en las primeras dos generaciones la transmisión es mayor. Gracias a este estudio también se pudo evidenciar que los mosquitos padres que fueron inoculados con el virus presentan mayor mortalidad. (Joshi, Mourya & Sharma, 2002).

3.5.3. Transmisión transovárica en el laboratorio

Casi todos los estudios que se han hecho sobre este tema se han llevado a cabo en laboratorio es decir que se les infecta el virus en laboratorio y determinan en su progenie si existe transmisión transovarial. Por ejemplo en 1992, Bocio *et al.*, usando el virus del dengue proveniente desde Jamaica, extraído a partir de sueros y aislado en células C6/36 de *Aedes albopictus*; se utilizó este virus para infectar a mosquitos *Aedes albopictus* a través de una inoculación intratorácica.

Rosen, 1987, también hizo un estudio de transmisión vertical en *Aedes albopictus*, infectando a los mosquitos en laboratorio a través de inoculación del virus dengue-1 intratorácicamente, esperando 14 días después para hacerles el análisis y ver si estos podían transmitir este virus adquirido en laboratorio.

3.5.4. Transmisión transovárica en la naturaleza

Existen también estudios de transmisión transovárica en la naturaleza, es decir que los mosquitos analizados para determinar la presencia del virus lo han adquirido a éste en su hábitat natural y no así en laboratorio.

Lee & Rohani, 2005. En su estudio sobre transmisión transovarial en *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* colectados por medio de ovitrampas en un área urbana de Malaysia. Hicieron eclosionar los huevos hasta larvas y a partir de ellas hicieron aislamientos del virus en células de la línea C6/36 para detectar la existencia del virus por medio de la prueba del PAP (peroxidasa anti peroxidasa).

Arunachalam en el 2008, también realizó un estudio de transmisión vertical para el virus del dengue en *Aedes aegypti*, colectando para este estudio machos adultos que ya estaban infectados del virus en la naturaleza, para luego hacerles una prueba de ELISA para saber el número de estos mosquitos que ya tenían el virus y si éstos eran capaces de transmitirlo a su progenie.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES:

4.1.1. Materiales de campo

- Bandeja de plástico
- Ovitrapas
- Pipetas
- Cucharones
- Frascos de 200 ml. (tapa rosca)
- Baldes de 8 litros
- Colador
- Paletas
- Papel filtro
- Jarras de 1 litro
- Aspirador manual
- Marcadores indelebles
- Peachimetro
- Bandejas de plástico

4.1.2. Materiales de laboratorio entomológico

- Bandejas metálicas
- Bandejas de plástico
- Aspirador manual
- Tubos con cloroformo (para matar mosquitos)
- Jaulas para mosquitos
- Alimento para perros LAUA
- Pipetas
- Estereoscopio
- Peachimetro

- Tubos eppendorff de 1.5 ml.
- Algodón
- Azúcar
- Pinzas
- Congelador de -70°C

➤ **Reactivos**

- Alcohol
- Cloroformo
- Agua destilada
- Agua de clorinada

4.1.3. Materiales de laboratorio Biología Molecular

- Estufa (de 37°C)
- Centrífuga (refrigerada, con rotor para tubos de 2 ml., temperatura regulable para 30 tubos y programable en tiempo y velocidad).
- Vortex (agitador electrónico).
- Termociclador (placa de 96 tubos de 0-2 ml. Con panel de programación de ciclos y temperatura).
- Campana (de flujo laminar, con luz UV y filtro HEPA)
- Triturador de mosquitos eléctrico
- Puntas para triturar mosquitos
- Tubos eppendorff (de 1,5 y de 2 ml.).
- Micropipetas (Pipetman Gilson de 10, 20, 100, 200 y 1000 μl).
- Tips de (20, 200 y 1000 μl con filtro).
- Gradillas
- Probetas (de 10, 25, 50 y 100 ml. de vidrio)
- Matraz de Erlenmeyer (de 100 ml. y de vidrio).
- Cámara de electroforesis

- Lámpara de luz ultravioleta
- Microonda
- Moldes de gel y peines
- Parafilm
- Agitador magnético
- Balanza eléctrica
- Generador (corriente alterna de 220 voltios).

➤ Reactivos

4.1.3.1. Extracción del virus

- CTAB (Bromuro de Cetil Trimetil Amonio).
- TBE (Tris Borate EDTA).
- PBS pH 7.4 (Phosphate Buffered Saline).
- B- mercaptoetanol
- Etanol (96-100%).
- Etanol al 70%
- Buffer RW1 (RNeasy Mini Handbook).
- Buffer RPE (concentrate) (RNeasy Mini Handbook).
- Buffer RLT(RNeasy Mini Handbook).
- RNase- Free Water (RNeasy Mini Handbook).

4.1.3.2. RT-PCR

- QIAGEN One Step RT-PCR Buffer 5x (QIAGEN One Step RT-PCR).
- dNTP Mix, 10 mM each (QIAGEN One Step RT-PCR).
- Dext1 (1/20) primers
- Dext2 (1/20) primers
- DMSO (Dimethyl Sulfoxide).

- Enzyme Mix (Contains Omniscript Reverse Transcriptase and Hotstar Taq DNA Polymerase) (QIAGEN One Step RT-PCR).
- RNase- Free Water (QIAGEN One Step RT-PCR).
- Aceite mineral

4.1.3.3. PCR

- QIAGEN PCR Buffer, 10x (Taq PCR Handbook).
- Mg Cl₂, 25 mM (Taq PCR Handbook).
- dNTP (RNeasy Mini Handbook).
- Dext1 (1/20) primers
- TS1, TS2, TS3, TS4 (primers).
- Taq DNA polymerase (RNeasy Mini Handbook).
- RNase- Free Water (RNeasy Mini Handbook).
- Aceite mineral

4.1.3.4. Electroforesis

- Agarosa
- TBE (Tris Borate EDTA).
- Bromuro de Etidio
- Loading buffer

4.1.3.5. Inoculación Celular

- PBS 1x estéril (Phosphate Buffered Saline).
- SBF (Suero Bovino Fetal).
- (Phosphate Buffered Saline).

4.1.3.6. Inmunofluorescencia

- PBS 1x estéril (Phosphate Buffered Saline).
- FAH (Fluido Acítico Hiperimmune) (Dengue, Mayaro, Fiebre Amarilla y Oropuche).
- FITC (Conjugate) (Affinity Isolated Antigen Specific Antibody)
- Acetona
- Azul de Evans
- FAH (Fluido Acítico Hiperimmune)
- Glicerol tamponado

4.1.4. Analisis Estadístico

El analisis estadístico de este trabajo se lo hizo utilizando el programa estadístico EPIINFO, programa de dominio público diseñado por el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta (CDC), de especial utilidad para a Salud Pública. Se dispuso de este progra EPIINFO versión 6.0 en abril de 1994.

EPIINFO, es la denominación de un conjunto lógico definido como "Programa procesador de palabras, base de datos y estadístico, tiene un grado de difusión elevado por ser de gran utilidad al estar avalado por la Organización Mundial de la Salud y el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta. (EUA).

4.1.6. Materiales de gabinete

- Papel
- Computadora e impresora
- USB
- Libretas de campo y de laboratorio

4.2. MÉTODOS:

4.2.1. Ubicación del Área de estudio

4.2.1.1. Muestreo en la ciudad Santa Cruz.

El municipio de la ciudad de Santa Cruz está situado en el este del país, en el margen derecho del río Piraí. Cuenta con una superficie de 388 kilómetros cuadrados con una población de 1.594.926 habitantes. La topografía de la ciudad es plana y presenta una densidad promedio de 50 habitantes por hectárea. La ciudad de Santa Cruz de la Sierra inicia un proceso de fuerte crecimiento a partir de los años 50 y en la década de los 70 la ciudad se integra al mercado nacional a través del crecimiento del transporte y las comunicaciones. Desde entonces la ciudad ha diversificado su economía y ha recibido un importante flujo migratorio. De contar en la década de los 50 con 41.000 habitantes pasó a tener en el 2001, 1.135.000 habitantes y una superficie aproximada de 30.000 hectáreas.

Se encuentra ubicada a una altura entre los 400 y 450 m.s.n.m., con latitud sur 17° 48' 02" y longitud oeste 63° 10' 41". Tiene un clima húmedo tropical, con una temperatura media anual de 26° C. En invierno las temperaturas caen hasta 10° C, entre los meses de junio a agosto; en verano las temperaturas se elevan hasta 38°C en los meses de diciembre a agosto. Con una humedad relativa media anual de 68% y los meses de mayor precipitación pluvial son enero y febrero, con precipitaciones que van desde 1200 mm. Hasta 1500 mm. (Gran Atlas de Bolivia, 2007).

La ciudad está dividida en 16 distritos municipales. Estos cuentan con un plan de urbanización lo cual los divide en Unidades Vecinales (UV) y Barrios, urbanísticamente está formada por 8 anillos concéntricos y radiales que delimitan las Unidades Vecinales que varían de 1,5 km a 2 km de anchura cada uno. (INE 2001).

Para este muestreo se designaron 100 puntos al azar en toda la ciudad y de cada punto se seleccionaron 10 viviendas en las que se hizo la encuesta entomológica, colectándose larvas de *Aedes aegypti* en todos los estadios y pupas, pero para este estudio solo se tomaron en cuenta las larvas de 4º estadio y las pupas. Esta encuesta denominada Epidengue realizada por una institución francesa denominada IRD (Instituto de investigación para el desarrollo) con apoyo del área de Entomología de CENETROP (Centro Nacional de Enfermedades Tropicales). Este trabajo se llevó a cabo en el mes de abril y mayo de 2007. (Ver Anexo 1).

4.2.1.2. Muestreo en el Barrio San Luís.

Otro punto que se tomó en cuenta para la colecta de mosquitos adultos y huevos fue el Barrio San Luís, que se encuentra ubicado entre 2º y 3º anillo, pertenece a la UV 31 y a la Red de Salud Centro y está a 2 kilómetros de la plaza central de la ciudad de Santa Cruz de la Sierra. Este barrio está completamente pavimentado y cuenta con servicios básicos de agua y luz, el estrato social en su mayoría es de clase media y baja.

En este punto se utilizaron dos metodologías distintas para la obtención de muestras: Se colectaron mosquitos adultos a través aspiradoras eléctricas en las casas con dengue confirmado por serología por el laboratorio de CENETROP y también se colectaron huevos a través de ovitrampas en 3 manzanos elegidos al azar y se dejó ovitrampas en 3 a 4 casas por manzano. Ambas metodologías se llevaron a cabo en los meses de febrero, marzo y abril.

4.2.2. Metodología a seguir

Para el siguiente trabajo se utilizaron diferentes metodologías:

- Para obtener los mosquitos se utilizaron las siguientes metodologías: encuesta larval (larvas de 4º estadio y pupas), ovitrampas (colecta de huevos) y aspiradora (mosquitos adultos).

- Para determinar la presencia del virus del Dengue se utilizó la metodología de extracción del virus y para su caracterización se hizo RT-PCR (Reverso Transcripción - Reacción en Cadena de la Polimerasa). y PCR (Reverso Transcripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa). (Ver Anexo 4, 5 y 6).
- Para la determinación de los serotipos del virus del Dengue se hizo electroforesis en gel de agarosa y además se hizo inoculación celular y se realizó también el método del Shell vial (Ver Anexo 8 y 9).

4.2.2.1. Ovitrapas

Para utilizar esta metodología se eligió el Barrio San Luis para llevar un control con las ovitrampas, se lo realizó durante 3 meses; febrero, marzo y abril de 2007. Estas consisten en recipientes pequeños de 14 cm. de altura por 6 cm. de diámetro y son de color negro; a estos recipientes se les agrega agua limpia hasta la mitad y papel filtro o paletas (bajador de lengua) donde los mosquitos depositan sus huevos. (Figura 10). Se colocó 4 ovitrampas por casa (2 peridomicilio y 2 intradomicilio) y se las dejó por el lapso de una semana.

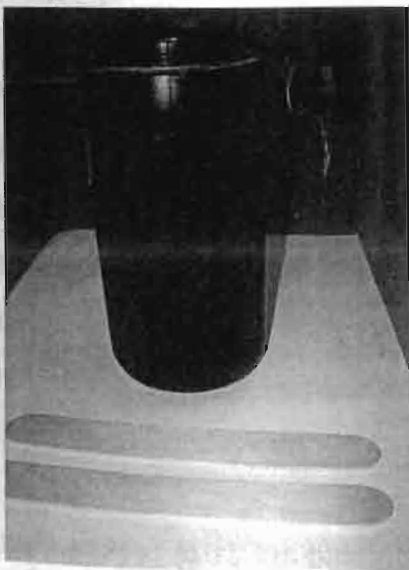


Figura 10. Ovitrapas y paletas



Figura 11. Papeles filtro con huevos de mosquitos

Al cabo de la semana se recogió las ovitrampas y se llevo a laboratorio donde se les extrae el agua observando que no haya larvas que ya hubiesen eclosionado de los huevos y se espero 24 a 48 horas que es el periodo que el embrión necesita para madurar y además este proceso asegura la resistencia de los huevos a la desecación por un periodo de 6 meses a un año.

Luego de este tiempo se sacaron los papeles filtro y las paletas y uno por uno se los observó con ayuda del estereoscopio y se va marcando y contando los huevos para luego guardarlos en laboratorio en las bandejas de plástico bien tapadas a una temperatura de 25 a 28 °C y una humedad relativa de 70 a 80% protegiéndolos de la acción de las hormigas depredadoras (Fig. 11). Los huevos no se deben utilizar antes de las 72 horas de la ovipuesta, pues de hacerlo no se produciría la eclosión, debido a la no maduración del embrión. (Pérez *et al.*, 2004).

En el mes de junio de 2007 parte de estos huevos colectados fueron puestos a eclosionar en 2 bandejas metálicas cuidando siempre que estén bien tapadas con telas tul con 1 litro y medio de agua declorinada (libre de cloro) a temperatura ambiente y se dejo reposar; el tiempo que éstos tardan en eclosionar depende del tiempo que los huevos tengan (a mayor tiempo almacenado menos viabilidad).

El tiempo que tardaron estos huevos en eclosionar fue de 1 a 3 horas. Se sacó los papeles filtro y las paletas y se alimentó las larvas de 1° estadio (que solo miden 1 mm. y al final del 4° hasta 7 mm). El alimento que se le da a las larvas es un alimento para perros en polvo, cuya composición es: harina de maíz, soya, carne, arroz, hueso, sales, vitaminas y minerales; para alimentarlas se moja la yema de los dedos se hace una pequeña bolita del alimento y se la deposita en el fondo de la bandeja donde están las larvas. (Ver Anexo 11; Fig. 26).

Los papeles filtro y las paletas que se sacaron de las bandejas se los puso a secar y se guardaron en bandejas de plástico protegiéndolos con tela tul para una

posterior puesta a eclosionar, pues no todos los huevos eclosionan al mismo tiempo y quedan aún huevos cerrados.

Así se alimentaron las larvas hasta que estas pasaron a pupas en aproximadamente 8 días, una vez pupas fueron colocadas en recipientes pequeños con un poco de agua de su misma bandeja y puestos en 2 jaulas. (Fig. 12 y 13).



Figura 12. Separando larvas de diferentes estadios



Figura 13. Pupas de mosquitos listas para llevar a las jaulas.

Las jaulas para mosquitos consisten en cajas hechas de hierro y forradas con tul, miden 30 cm. de alto x 30 cm. de ancho, tienen una pequeña manga lateral que es por donde se alimenta a los mosquitos para disminuir el riesgo de escape. Las pupas no necesitan alimento para pasar a adultos y tardan mas o menos una semana en hacerlo, además que no todas las pupas pasan a un mismo tiempo a ser adultos. (Figura 14 y 15).

Una vez adultos no se los alimentó con sangre de ratones de laboratorio como suele hacerse, solo se les colocó paños de algodón empapados de agua azucarada encima de las jaulas (cambiando 3 veces a la semana) esto para que

DETERMINACIÓN DE LA EXISTENCIA DEL FENÓMENO DE TRANSMISIÓN TRANSOVÁRICA EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) DURANTE LA EPIDEMIA DE DENGUE 2007 EN LA CIUDAD DE SANTA CRUZ DE LA SIERRA - BOLIVIA.. Cruz Zambrana Mirian

tengan resistencia y no se mueran rápidamente es decir que el azúcar se lo utiliza como fuente de energía. (Ver Anexo 11; Fig. 25).

Al cabo de una semana ya todos los mosquitos habían llegado al estado adulto, y fueron extraídos de sus jaulas con ayuda de un aspirador manual para luego colocarlos en tubos con cloroformo para que mueran. Con ayuda del estereoscopio se los diferenció en machos y hembras y luego se los separó en lotes (15 mosquitos en un tubo eppendorf) para luego llevarlos a conservar a un refrigerador de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

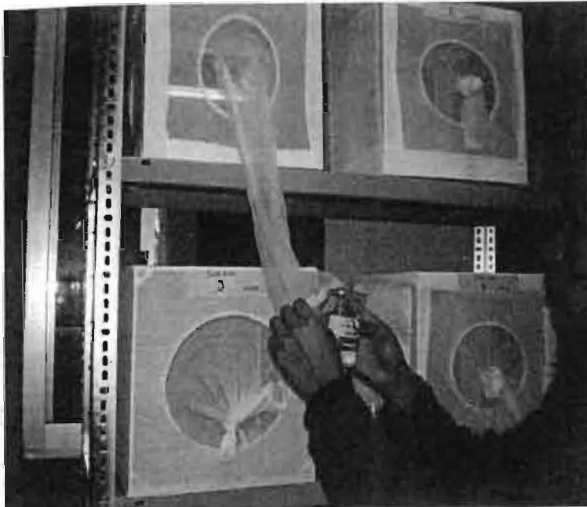


Figura 14. Jaulas para los mosquitos Adultos.



Figura 15. Mosquitos emergiendo en jaulas.

En el mes de julio de 2007 se sacaron otra vez las paletas y papeles que anteriormente fueron guardados y con ayuda del estereoscopio verificamos que aún habían huevos cerrados, de esta manera es que se agregó agua declorinada a 4 bandejas de metal y se colocó todos los huevos de las paletas guardadas en abril.

En este estudio las larvas tardaron en emerger de 3 a 5 horas y de la misma forma que las anteriores se las alimentó hasta que fueron adultos y se separó los

machos de las hembras, seleccionándolos en lotes de 15 mosquitos en cada tubo eppendorf para luego llevarlos a un congelador de -80°C .

4.2.2.2. Encuesta larval

Esta metodología de encuesta entomológica se la llevó a cabo en los meses de abril y mayo de 2007 en toda la ciudad de Santa Cruz de la Sierra. Se tomaron en cuenta para este trabajo 100 puntos al azar y de cada punto se muestrearon 10 viviendas en toda la ciudad. (Ver Anexo. 1).

En esta encuesta se colectaron larvas de todos los estadios y pupas pero para este trabajo solo se tomó en cuenta las larvas de 4° estadio y las pupas en ambos casos solo se diferenciaron por el tipo de criadero del que provenían (llantas, floreros, turriles y pequeños), identificando cada espécimen para percatarse de que eran larvas de *Aedes aegypti* (Anexo 3).

Como las pupas no necesitan alimentarse se las colocó directamente en un recipiente pequeño con agua y se las puso en jaulas. Las pupas tardan de 2 a 3 días para pasar a adultos. Se los colocó en 4 jaulas diferenciándose en llantas, floreros, turriles y pequeños.

A estos mosquitos se los alimentó con sangre de ratones de laboratorio cada 3 días, para las jaulas de llantas y pequeños se colocó 4 ratones y para floreros solo 2 ya que estos eran pocos, y se los dejaba por el lapso de 2 horas. (Anexo 11; Fig. 24).

Al cabo de 45 días se procedió a matar a todos los mosquitos de las 4 jaulas extrayéndolos de las jaulas con ayuda del aspirador manual, para matarlos se los colocó en tubos con cloroformo. Con ayuda del estereoscopio se diferencio en machos y hembras y se los separó en lotes (de hasta 15 mosquitos por cada tubo eppendorf) para llevarlos al congelador a -80°C .

Las larvas de 4° estadio se colocaron en bandejas de metal con 1 litro y medio de agua descansada (sin cloro) (Figura 16) y se los alimento con alimentó con alimento para perros como en los anteriores casos. El ciclo larval de *Aedes aegypti* dura de 5 a 7 días en condiciones óptimas de laboratorio que son las siguientes: Iluminación 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad; Temperatura de 24 a 28 °C; Humedad Relativa de 70 a 80%, según (Gadelha C., Toda, 1985 anunciado por Pérez *et al.*, 2004).



Figura 16. Bandejas con larvas de *Aedes aegypti*

Después de 2 días las larvas pasaron a pupas y estas fueron colocadas en pequeños recipientes con un poco de agua y colocadas en las jaulas exactamente igual que lo que pasó con las anteriores pupas y una vez emergieron los adultos se los mató y se los diferenció en machos y hembras y se los colocó en tubos eppendorf para conservar el virus a -80°C.

4.2.2.3. Captura de adultos

Esta técnica se la utilizó en el Barrio San Luís en casas que tenían dengue confirmado por serología en CENETROP se la realizó en el mes de febrero de 2007.

Esta metodología se emplea para capturar mosquitos adultos, utilizando una aspiradora eléctrica; que consiste en una especie de mochila que se coloca a la espalda, funciona con una batería y aspira aire a través de un caño, aspirando a los mosquitos con el aire. (Fig. 17).



Figura 17. Aspiradora de mosquitos

Se ubicaron las casas positivas para dengue y se las visitó una por una. Allí se aspiró mosquitos especialmente en los dormitorios, por debajo de la cama, debajo de las mesas, sillas y lugares donde no llega mucho la luz.

Luego de que los mosquitos adultos fueron aspirados se procedió a la identificación de *Aedes aegypti* (Anexo 3) que se encontraban en la bolsa de tul que lleva en la entrada la aspiradora y se contaron los machos y las hembras, se hizo lotes de hasta 15 mosquitos en cada tubo eppendorf y se los llevó a -80 °C.

4.2.3. Extracción del ARN viral

Para realizar esta técnica se extrajo los todos los tubos eppendorf con mosquitos que se encontraban a -80°C y se procedió a hacer la extracción del virus.



Figura 18. Triturando mosquitos para hacerles extracción

El ARN viral fue extraído utilizando el manual de QIAGEN del manual RNeasy® Mini Handbook, Cuarta Edición, Abril 2006. RNeasy Mini Kit, número de catálogo: 74104 (50 determinaciones) y 74106 (250 determinaciones). De acuerdo con el protocolo establecido por el fabricante. Ver (Anexo 4).

4.2.4. Cepas control

Todas las cepas control (DEN-1, DEM-2, DEN-3 y DEN-4) que se utilizaron en este trabajo fueron aisladas a partir de sueros en el laboratorio de virología CENETROP, el molecular de los serotipos de dengue son los siguientes:

DENGUE-1= 482 Pares de Bases.

DENGUE-2= 119 Pares de Bases.

DENGUE-3= 290 Pares de Bases.

DENGUE-4= 392 Pares de Bases.

4.2.5. RT-PCR (Reverso Transcripción- Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Se aplicó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con Transcriptasa Reversa (RT-PCR) descrita por Lanciotti et al, (1992). para convertir inicialmente el ARN total extraído de los mosquitos a ADNc. Esto debido a que el ARN es altamente sensible a las temperaturas y a un sin número de sustancias que lo desnaturalizan. Por el contrario el ADN es estable y muy sencillo de conservar y manejar. En este método se usaron dos primers y la enzima QIAGEN One Step RT-PCR Enzyme Mix. Ver (Anexo 5).



Figura 19. Procesando muestras en el termociclador

Se dejó que procedieran las reacciones en un Termociclador (Fig. 19) programado de la siguiente manera:

- 4 pre – PCR
- | | |
|------------------|---|
| 50°C.....45 min. | } Transcripción reversa, sintetizando cDNA a partir de una molécula de ARN. |
| 94°C.....7 min. | |
| 55°C.....45 min. | |
| 72°C.....45 min. | |

- 3 Tmp. 39 Ciclos
 - 92°C.....30 seg.
 - 55°C.....30 seg.
 - 72°C.....30 seg. } Polimerización del cADN

- 2 Holds
 - 72°C.....7 min.
 - 4°C.....∞ } Se ordenan todas las hebras secuenciadas.

Después de correr las muestras en el termociclador se procedió a hacerles un PCR a todas, para multiplicar el ADN del virus.

4.2.6. Heminested PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Este método se lo utilizó para duplicar el ADNc en millones de copias que nos permitan su caracterización. En este trabajo se siguió el Método de Lanciotti *et al*, (1992), utilizando 4 primers que corresponden a los 4 serotipos de dengue y la enzima Taq ADN Polimerase QIAGEN. (Anexo 6).

Se dejó que procedan las reacciones en un Termociclador para incubación programado de la siguiente manera:

- 3 Pre – PCR
 - 94°C.....7 min.
 - 55°C.....45 seg.
 - 72°C.....45 seg. } Activación de la enzima Polimerasa.

- 3 Tmp. 39 Ciclos
 - 92°C.....30 seg. → Desnaturalización
 - 55°C.....30 seg. → Alineación
 - 72°C.....30 seg. → Elongación

- Holds
 - 72°C.....7 min. } Se ordenan todas
 - 4°C..... ∞ } las hebras secuenciadas.

Los productos del Heminested PCR en un volumen de 5 µl junto a 3 µl de Loading Buffer (colorante) fueron sembrados y corridos en gel de agarosa al 2% y teñido con Bromuro de Etidio 10 µg/ml, el tiempo de electroforesis que se empleo fue de 45 min. con 80 Voltios y el marcador de peso molecular utilizado fue de 100 pares de bases (en ún volumen de 5 µl). Fue visualizado en un transiluminador UV y fotografiados con una cámara digital. Ver (Anexo 7).

4.2.7. Aislamiento viral

Para el aislamiento del virus del dengue se usaron dos métodos diferentes:

- Inoculación celular
- Shell Vial

4.2.7.1. Inoculación celular

Para este método se utilizó la línea celular C6/36 HT, método muy rápido, sensible y económico para el aislamiento del virus del dengue son y que han sido elaboradas a partir de células de *Aedes albopictus*. Los antígenos del virus del dengue se pueden detectar en los cultivos celulares infectados mediante IFI. Después de inocular las células se esperó un período de 10 días revisando todos los días para ver si había Efecto Citopatogénico (ECP) y luego todos los cultivos

celulares fueron sometidos a Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), utilizando como antígenos los 4 serotipos de dengue. Ver (Anexo 8).

4.2.7.2. Shell Vial

Este método del Shell Vial también llamado centrifugación en placa fue utilizado también en este trabajo ya que es muy útil en el aislamiento del virus del dengue a los 5 días de incubación y además es muy rápido comparado con otros métodos. Después de los 5 días de incubación se hizo Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) de todos los cultivos celulares utilizando como antígenos los 4 serotipos de dengue. En los casos que salieron negativos se les hizo 2 pases para confirmar resultados. Ver (Anexo 9).

5. RESULTADOS

De los 100 lotes (1404 mosquitos) que tomaron en cuenta para el estudio de transmisión transovárica, colectados en los meses de febrero, marzo, abril y mayo del año 2007 en la ciudad de Santa Cruz de la Sierra 14 lotes resultaron positivos para el virus del dengue. (Anexo 10).

Tabla 1. Total de mosquitos colectados para el estudio de Transmisión Transovárica.

	Nº de mosquitos	Nº de lotes	Nº de lotes positivos Serotipo Dengue-1	Nº de lotes positivos Serotipo Dengue-3	Total lotes positivos
Machos	656	49	3	8	11
Hembras	748	51	2	1	3
TOTAL	1404	100	5	9	14

La tasa de infección mínima para este estudio de la transmisión transovárica valorada por la prueba de RT-PCR (Retrotranscripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa) es de al menos 1% la tasa mínima (considerando 1 mosquito infectado por lote positivo) y la máxima es de 14% (considerando que todos los mosquitos de un lote positivo estuviesen infectados).

En cuanto a los serotipos circulantes en esta epidemia de 2007 en la ciudad de Santa Cruz corresponden a Dengue-3 con 9 lotes positivos y Dengue-1 con 5 lotes positivos, cabe resaltar que no se encontró Dengue-2 que estuvo circulando en la epidemia de 2007 y tampoco encontramos Dengue-4, pero que éste serotipo nunca fue reportado en Bolivia. (Anexo 7).

Considerando los lotes positivos tenemos que el 22,4% corresponde a machos y el 5,9% corresponde a hembras, tomando en cuenta estos índices la diferencia de

lotes entre machos y hembras resulta significativa (Yates corregido, $X^2 = 4,40$; $p=0,0359$). Ver (Anexo 2).

Tomando en cuenta la tasa mínima de 1% conseguimos calcular que el porcentaje de infección para los machos es de 1,68% y 0,40% para las hembras; la diferencia entre machos y hembras resulta significativa (X^2 de Mantel-Haenszel con corrección de Yates = 4,54; $p=0,0331$). Ver (Anexo 2).

Considerando que los mosquitos provienen de dos lugares y técnicas de colecta distintos (ovitrapas en el Barrio San Luis y colecta larval en toda la ciudad de Santa Cruz), hicimos una comparación de los mosquitos positivos provenientes de ambas colectas. Los resultados por tipo de colecta se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Total de mosquitos colectados de acuerdo a la metodología utilizada.

Tipo de colecta	Sexo	Nº de mosquitos	Nº de lotes	Nº de lotes positivos Serotipo Dengue-1	Nº de lotes positivos Serotipo Dengue-3
Ovitrapas Barrio San Luis	Machos	464	32	0	4
	Hembras	463	32	0	0
Colecta de adultos Barrio San Luis	Machos	18	3	0	0
	Hembras	0	0	0	0
Encuesta larval Santa Cruz – ciudad	Machos	174	14	3	4
	Hembras	285	19	2	1
TOTAL		1404	100	5	9

El índice mínimo de infestación para los mosquitos provenientes del Barrio San Luis (colectados por ovitrapas) es de 0,43% y para los mosquitos de la ciudad de Santa Cruz (colectados en pupas y larvas de 4º estadio) es de 2,18%. Esta diferencia es significativa (test exacto bilateral de Fisher; $p = 0,004$). (Anexo 2).

Referente a los mosquitos colectados en el estadio de huevo en el Barrio San Luís, no hay diferencia significativa entre mosquitos positivos machos y hembras; ya que los machos muestran un índice de infestación de 0,86% y las hembras un 0.00% (test exacto de Fisher unilateral; $p = 0,624$).

Por otro lado, para los mosquitos que provienen de las encuestas larvales en la ciudad de Santa Cruz, la diferencia entre los porcentajes positivos de machos (4,02%) y hembras (1,05%) es marginalmente significativa (test exacto de Fisher; $p = 0,046$). Ver (Anexo 2).

6. DISCUSIÓN

En este trabajo se pudo evidenciar la transmisión transovarial del mosquito *Aedes aegypti* (vector del dengue) en nuestra ciudad, por medio del método de PCR, método rápido, sensible y específico para la detección y tipificación del virus del dengue. Este método es ampliamente usado para la detección rápida de serotipos del dengue a partir de sueros como ocurrió en una epidemia de Colombia, Nicaragua y Panamá en el año 1998, en dicho trabajo se recogieron 27 muestras de pacientes con dengue durante la fase aguda de la enfermedad, a las cuales se les hizo RT-PCR y después un PCR resultando 13 muestras positivas para el virus del dengue. (Dominguez, *et al.*, 1998). Para este trabajo se colectaron 1404 mosquitos agrupados en 100 pools de los cuales 14 resultaron positivos para el virus del dengue.

Se han hecho también estudios a partir de mosquitos para detectar el virus del dengue semejante al trabajo que se hizo en esta oportunidad, dando buenos resultados en cuanto a la detección del virus del dengue en mosquitos colectados en nuestra ciudad durante la epidemia de 2007, como un caso ocurrido en el Perú donde se colectaron 93 mosquitos hembras agrupados en 12 pools, colectados en diversas áreas endémicas para *Aedes aegypti* en ese país, estas muestras fueron pasadas por un RT-PCR y luego por un PCR y los productos de estas reacciones se hicieron correr en un gel de agarosa de 1,5% dando resultados que fueron desde ausencia del serotipo hasta la presencia de 3 serotipos en una misma muestra. (Cáceres, 2003). En el presente estudio se logró identificar 2 serotipos de dengue: Den-1 y Den-3 por medio de electroforesis corrida en un gel de agarosa al 2% tomando como referencia controles negativos y controles positivos (Den-1, Den-2, Den-3 y Den-4), además de un marcador molecular.

La transmisión transovárica del virus del dengue en la India es la responsable de la persistencia del virus durante períodos interepidémicos, demostrado por: Bennet y Vinod, (2008) en un trabajo comparativo de porcentaje de transmisión

transovarial entre *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* colectados en época de verano y lluviosa donde *Aedes aegypti* presentó mayor infección por el virus del dengue. En esta investigación se demostró un porcentaje de infección por el dengue de 1%, lo que significa que en cada lote positivo de 15 mosquitos, uno estaba infectado con el virus del dengue. Por otro lado se conoce que Den-3 inoculado en mosquitos criados desde huevos en laboratorio transmitieron el virus hasta la séptima generación con una tasa que va desde 15,5% hasta 67,5%, observando que el virus tenía efecto nocivo en su viabilidad para los huevos y las etapas larvales y pupales. El efecto nocivo sobre los huevos fue de 33,0% a 68,1% impidiendo que éstos lleguen a adultos. (Joshi & Sharma, 2001).

Para este trabajo los mosquitos que se obtuvieron fue a partir de huevos, larvas y pupas criados en laboratorio sin que hayan tenido contacto con el hombre, es decir que si dieron positivos para el virus del dengue éstos ya venían infectados desde huevos, no se les infectó con el virus en laboratorio, como ocurre en una experiencia de (Rohani *et al.*, 2008) donde se les infecta a los mosquitos el virus Den-2 en laboratorio, éstos fueron mantenidos y observados hasta las siguientes 7 generaciones sucesivas, los mosquitos mostraron infección por este virus hasta la quinta generación, pero estuvieron ausentes en la sexta y séptima generación. En este trabajo que aquí se presenta se detecta dos serotipos pero solo se observó una generación.

La tasa de infección para los mosquitos machos es de 1,68% y para las hembras es de 0,40% esto muestra que los machos también se infectan con el virus del dengue aunque no por la picadura sino transovarialmente al igual que las hembras de forma similar a un estudio de transmisión transovárica que se hizo en la India donde se utilizaron solo machos, obteniendo resultados positivos. (Arunachalam *et al.*, 2008). Además en este trabajo se demuestra que el virus del dengue esta sobreviviendo en épocas secas e invierno gracias a la transmisión transovárica de la misma forma que se ha demostrado en la presente investigación.

DETERMINACIÓN DE LA EXISTENCIA DEL FENÓMENO DE TRANSMISIÓN TRANSOVÁRICA EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) DURANTE LA EPIDEMIA DE DENGUE 2007 EN LA CIUDAD DE SANTA CRUZ DE LA SIERRA - BOLIVIA.. Cruz Zambrana Mirian

Por otro lado se tiene información que en Trinidad se aisló el virus Dengue-4 en una muestra de mosquitos de hembras y machos desarrollados a partir de huevos, los cuales se colectaron en criaderos de las casas donde hubo casos de dengue y la tasa transmisión transovárica mínima fue de 1:1855. (Hull, *et al.*, 1984) Lo que significa que los mosquitos machos también pueden contraer el virus a través de la madre como ya se ha comprobado.

En cuanto a los huevos de *Aedes aegypti* se dice que el virus hiberna en éstos cuando la epidemia disminuye ya que los huevos embrionados de este mosquito y colocados a eclosionar tienen una sobrevivencia de 7 al 40% después de una exposición de 4 meses de sequía. (Trpis, 1972). Ahora bien se ha notificado que en *Aedes aegypti* solo el 10% de los huevos puestos en los criaderos llega a desarrollar hasta larva de 3° y 4° estadio y lo que explicaría la diferencia de índices de infestación en mosquitos provenientes del Barrio San Luís; huevos, (índ. de infestación 0,43%), y mosquitos provenientes de la encuesta de toda la ciudad; larvas de 4° estadio y pupas. (índ. de infestación 2,18%).

7. CONCLUSIONES

- a) Con este estudio se ha demostrado la existencia del fenómeno de transmisión transovárica de virus del dengue en mosquitos *Ae. aegypti* en la ciudad de Santa Cruz de la Sierra.
- b) Se ha evidenciado mayor Transmisión Transovárica en machos que en hembras *Ae. aegypti*.
- c) Primer estudio que demuestra la diferencia de Transmisión transovárica entre machos y hembras.
- d) Los muestreos de larvas larvas de 4° estadio y pupas resultan adecuados para evaluar tasas de Tasas de Transmisión transovárica
- e) Un estudio de transmisión transovárica es capaz de detectar serotipos del virus del dengue antes de encontrarlos circulando en una epidemia.

8. RECOMENDACIONES

- Incorporar estudios de transmisión transovárica del virus del dengue en *Aedes aegypti* en programas de Vigilancia Epidemiológica.
- Estudiar la transmisión transovárica del virus del dengue en *Aedes aegypti* durante periodos interepidémicos.
- Realizar estudios de transmisión sexual de virus del dengue en *Aedes aegypti*.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, T. H. *et al.*, (1979). Transmission of yellow fever virus by mosquitoes (*Aedes aegypti*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28:119-21 pp.
- ARUNACHALAM, N. *et al.*, (2008). Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Chennai, Tamil Nadu, India. *Indian J Med Res* 127 : 395-397
- AVILES, G. (2000). Epidemia por Virus Dengue-2 en Salta, Argentina, 1998. *Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires.* 60: pp. 875-879.
- BADII, M. H., *et al.* (2007). Ecología e Historia del Dengue en las Américas. *Daena: International Journal of Good Conscience.* 2(2): 309-333. Abril 2007 – Septiembre 2007.
- BENNET, A. & JOSHI, V. (2008). Distribution and seasonality of vertically transmitted dengue viruses in *Aedes* mosquitoes in arid and semi-arid areas of Rajasthan, India. *J Vector Borne Dis.* 45: 56-59 pp.
- BOSIO, C. F. (1992). Variation in the efficiency of Vertical Transmission of Dengue-1 Virus by Strains of *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae). *Journal of Medical Entomology.* 29(6). pp. 985-989.
- CABEZAS, C. (2005). Dengue en el Perú: Aportes para su diagnóstico y control. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica.* 22(3). pp. 212-228.

- CÁCERES, R. O. (2003). Detección Rápida de los Serotipos del Virus Dengue en el Mosquito *Aedes aegypti*. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. 20 (003). pp. 156-158.
- COONS *et al.*, (1941). Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. Proc Soc Exptl Biol Med; 47:200-204.
- DOMINGUEZ, D. R. *et al.*, (1998). Reacción en cadena de la polimerasa para la detección rápida y determinación del serotipo de virus del dengue en muestras clínicas. Rev Panam Salud Pública. 4(1). 1-11 pp.
- DUFFAU, G. (1995). Estadística en el Programa Epiinfo 6.0. Rev. Chil. Pediatr. 66(6). 341-344 pp.
- FINLAY, C., (1881). El mosquito hipotéticamente considerado como agente de transmisión de la Fiebre Amarilla. Rev. Acad. Cienc. Habana. 18 pp. 147-69.
- FUNASA, (2002). Fundação Nacional de Saúde. Programa Nacional de Controle da Dengue. Brasília.
- GÓMEZ, S. y CORTÉS, F. (2007). Serotipo, Patrón de Infección y Dengue Hemorrágico en Área Endémica Colombiana. 2007. 9(2). pp. 262-274.
- Gran Atlas de Bolivia, (2007). Cbba-Bolivia. Editorial Panamericana Books.
- GIANELLA, A. *et al.* (1998). Brote epidémico de denguevirus 2, genotipo Jamaica, en Bolivia. Salud Pública de México. 40(6). pp. 469-473.

- GUBLER, D. & TRENT, D. (1994). Emergence of epidemic dengue, dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. *Infec. Agents. Dis.* 2:383.
- GUZMAN, M. G., GARCIA G. & KOURI, G., (2006). El Dengue Hemorrágico: Prioridades de Investigación. *Revista Panamericana de Salud Publica.* 19(3). pp. 204-215.
- HERNÁNDEZ, F. & GARCÍA, J., (2000). *Aedes*, dengue y la posibilidad de un enfoque diferente de lucha. *Revista Costarricense de Salud Pública* 9(16). pp. 32-38.
- HERNANDEZ, X. R. (2005). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. *EPIDEMIOLOGÍA, Sistema único de Información.* 37(22).
- HULL, B. *et al.*, (1984). Natural transovarial transmission of a dengue 4 virus en *Aedes aegypti* in Trinidad. *Am J Trop Med Hyg* 33: 1248-1250.
- JAN, C. & COZ, J., (1977). First evidence of natural transmission of yellow fever virus in *Aedes aegypti*, its epidemic vector. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Higiene.* 91(5), 533-535 pp.
- JHOSHI, V. & SHARMA, R. C. (2001). Impact of Vertically-transmitted Dengue Virus on Viability of Eggs of Virus-Inoculated *Aedes aegypti*. *Dengue Bulletin.* 25 103-106 pp.
- JORDANO, B. P. (2000). Utilidad y aplicaciones de Técnicas Moleculares en Ecología y Conservación de Especies. Estación Biológica de Doñana, CSIC.

- JOSHI, V., MOURYA, D.T. & SHARMA, R. C., (2002). Persistence of Dengue-3 Virus through Transovarial Transmission Passage in Successive Generations of *Aedes Aegypti* Mosquitoes. Am. J Trop. Med. Hyg. 67(2). pp. 158-161.
- KOURI, G. (2006). El Dengue, un problema Creciente de Salud en las Américas. Revista Panamericana de Salud Publica.19 (3). pp. 143-145.
- LANCIOTTI, R. *et al.*, (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polimerase chain reaction. J Clin Microbiol ; 30: 545-51 pp.
- LARA, J., *et al.* (2006). El diagnóstico Molecular y PRRS: Aplicaciones prácticas. Memorias del XLI Congreso Nacional de AMVEC, A. C. Ixtapa, Guerrero.
- LEAVERTON, P. E., (1989). ABC de la Bioestadística, Programa de Autoaprendizaje. 3° Edición, Editorial SALVAT EDITORES S. A. Barcelona España. 126 pp.
- LEE, H. L. & ROHANI, A., (2005). Transovarial Transmission of Dengue Virus in *Aedes Aegypti* and *Aedes albopictus* in Relation to Dengue outbreak in an Urban Area in Malaysia. Dengue Bulletin. 29: 106-111 pp.
- MAGUIÑA, C., *et al.* (2005). Dengue Clásico y Hemorrágico: Una enfermedad Reemergente y Emergente en el Perú. 16(2). pp. 120-140.
- MAMANI, Z. E., *et al.* (2005). Tipificación Molecular del Virus Dengue 3 Durante el Brote Epidémico de Dengue Clásico en Lima, Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 22(003). pp. 161-164.

DETERMINACIÓN DE LA EXISTENCIA DEL FENÓMENO DE TRANSMISIÓN TRANSOVÁRICA EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) DURANTE LA EPIDEMIA DE DENGUE 2007 EN LA CIUDAD DE SANTA CRUZ DE LA SIERRA - BOLIVIA.. Cruz Zambrana Mirian

- MARCHOUX, E. & SIMOND, P. L. (1906). Études da la fièvre jaune. Ann Inst Pasteur. 20: 104-148 pp.
- Ministerio de Desarrollo Humano. (2004). Gobierno de la Provincia Formosa. No al Dengue. Trabajemos Juntos.
- MITCHELL, C. J. & MILLER, B. R., (1990). Vertical Transmission of Dengue Virases by Strains of *Aedes albopictus* Recently introduced into Brazil. J Am Mosq Control Assoc. 6(2), 251-253 pp.
- Organización Panamericana de la Salud. Dengue y Dengue Hemorrágico en las Americas: Guías para su prevención y Control. Washington, DC: OPS; (1995). (Publicación Científica N° 548). pp 3-22.
- PAHO. (2000a). Promoción de estrategias para el estímulo de la participación comunitaria y la educación popular en el control del Dengue a través de la comunicación social. Lima, Perú, 25 al 27 de Abril, 2000. OPS/HCP/HCT/172.00.
- PAHO. (2000b). Reunión Sub-Regional Sobre la Promoción de Estrategias para el Estimulo de la Participación Comunitaria y la Educación Popular en el Control del Dengue a través de la Comunicación Social, Países del Cono Sur, Asunción, Paraguay 10 al 12 de Mayo, 2000. OPS/HCP/HCT/173.00.
- PEREZ, O, et al, (2004). Manual de Indicaciones Técnicas para Insectarios. Editorial Ciencias Médicas. Ciudad de La Habana, Cuba. 59 pp.

- QIAGEN del manual RNeasy® Mini Handbook, Cuarta Edición, Abril (2006). RNeasy Mini Kit, número de catálogo: 74104 (50 determinaciones) y 74106 (250 determinaciones).
- RIGGS, J. L. *et al.*, (1958). Isotiocyanate compounds as fluorescent labeling agent for immune serum. *Am J Pathol.* 34:1081.
- RODRIGUEZ, M. & MARZAL M., (2004). Dengue: Una Revisión. Curso Latinoamericano sobre Enfermedades Infecciosas. Instituto de Biomedicina. UCV. Caracas-Venezuela.
- ROHANI, A. *et al* (2008). Persistency of Transovarial Dengue virus in *Aedes aegypti* (LINN). *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 39(5). 813-816 pp.
- ROSEN, L. *et al.*, (1985). Comparative susceptibility of mosquito species and strains to oral and parenteral infection with dengue and Japanese encephalitis viruses. *Am J Trop Med Hyg*, 34 (3), 63-615 pp.
- ROSEN, L., (1987). Sexual Transmission of Dengue Viruses by *Aedes albopictus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37(2). pp. 398-402.
- ROSEN, L., (1987). Overwintering mechanism of mosquito – borne arboviruses in temperate climates. *Am J Trop Med Hyg*; 37: 695-765 pp.
- ROSEN, L. (1988). Further Observations on the Mechananism of Vertical Transmission of Flaviviruses by *Aedes* Mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39(1). pp. 123-126.

DETERMINACIÓN DE LA EXISTENCIA DEL FENÓMENO DE TRANSMISIÓN TRANSOVÁRICA EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) DURANTE LA EPIDEMIA DE DENGUE 2007 EN LA CIUDAD DE SANTA CRUZ DE LA SIERRA - BOLIVIA.. Cruz Zambrana Mirian

- SALAS, E. & ARENAS, R. (2001). Biología Molecular en Micología. Dermatología Venezolana, 39. pp. 07-10.
- SALVATELLA, R. (1996). *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) y su papel como vector en las Américas. La situación en Uruguay. Revista Médica de Uruguay. 12 pp. 28-36.
- SOKAL, R. & ROHLF, F. J., (1997). BIOMETRY. The principles and practice of statistics in Biological Research. Third Edición. Edit. W. H. FREEMAN AND COMPANY. New York, 887 pp.
- SOUTHWOOD, T. (1972). Studies on the life budget of *Aedes aegypti* in wot Samphaya, Bangkok, Thailand. Bull World Health Organ. 46: 211-226 pp.
- Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico y la Caracterización del Virus del Dengue. (2003). Instituto de Medicina tropical "Pedro Kouri" Centro Colaborador de la OPS/OMS para el Estudio de las Enfermedades Víricas. La Habana, Cuba.
- TESH, R. B., CHANIOTIS B. N. & JOHNSON, K. M. (1972). Vesicular Estomatitis Virus (Indiana Serotype): Transovarial Transmission by Phlebotomine Sandflies. Science. 175: 1477-1479 pp.
- TESH R. B., *et al.*, (1977). Studies of Transovarial Transmission of Yellow Fever and Japanese Encephalitis Viruses in *Aedes* Mosquitoes and their Implication for the Epidemiology of dengue. In: Dengue in the Caribbean. Pan American Health Organization. Scientific Publication No. 375, pp. 179-182.

- TRPIS, M. (1972). Dry season survival of *Aedes aegypti* eggs in various breeding sites in the Dar es Salaam area, Tanzania. Bull World Health Organ. 47: 433-437 pp.
- VAZEILLE, M, *et al.*, (2007); Failloux AB Two Chikungunya Isolates from the Outbreak of La Reunion (Indian Ocean) Exhibit Different Patterns of Infection in the Mosquito, *Aedes albopictus*.; PLoS ONE 2(11): e1168.

ANEXOS

10. ANEXOS

Anexo. 1

Figura 20. Mapa de la ciudad de Santa Cruz de la Sierra con los 100 puntos elegidos al azar.



Encuesta "Epidengue" en Santa Cruz de la Sierra, abril y mayo 2007: Ubicación de los 100 racimos (Annie Walter, Phil Bremond y M. Donnat).

Anexo. 2

TEST de MANTEL – HAEENSZEL

Este test se basa en experimentos que tienen pocas observaciones individuales tomando en cuenta la cantidad de la muestra.

Es una medida de asociación lineal entre las variables de las filas y de las columnas en una tabla de contingencia.

Se calcula multiplicando el coeficiente de correlación de Pearson por el número de casos -1 . Tiene un solo grado de libertad. (Sokal and Rohlf, 1997).

TEST exacto bilateral de FISHER

Permite indicar si dos variables dicotómicas están asociadas cuando la muestra a estudiar es demasiado pequeña y no se cumplen las condiciones necesarias para la aplicación del X^2 . Estas condiciones exigen que los valores esperados de al menos el 80% de las celdas en una tabla de contingencia sean mayores de 5. (Leaverton, 1989).

CORRECCIÓN DE YATES

La corrección de Yates se aplica a la prueba de X^2 cuando al menos el valor de una frecuencia es menor que 5. En general se aplica la corrección de Yates o también corrección por continuidad cuando aproximamos una variable discreta a una distribución continua. La corrección consiste en añadir y restar 0,5 a la variable en cuestión. (Leaverton, 1989).

Anexo. 3

Clave taxonómica para identificar larva y adulto de *Aedes aegypti*

Larva

- 1. Segmento anal que no está rodeado por una placa.....8
- 8. Segmento anal sin placa pequeña de forma triangular en la base del cepillo ventral.....9
- 9. Sifón con un par de pelos con más de dos ranas.....11
- 11. Octavo segmento con una fila de escamas.....larva de *Ae. aegypti*

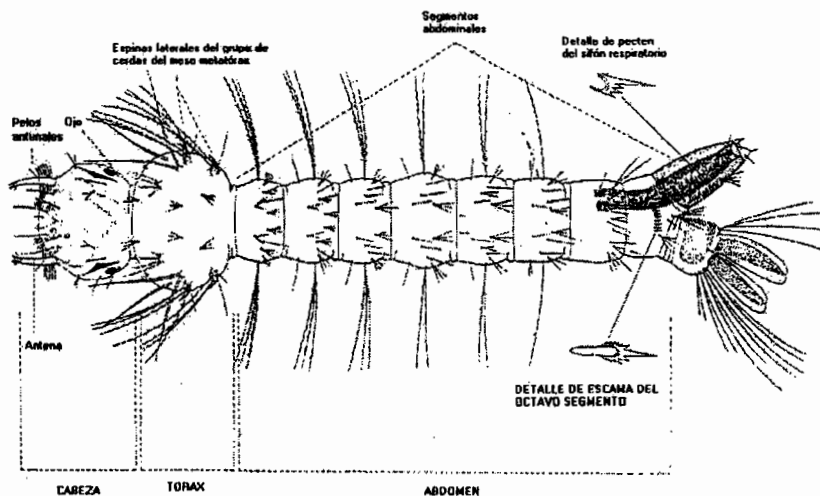


Figura 21. Larva de *Aedes aegypti*

Adulto

- 1. Uñas de los tarsos con dientes al menos en las patas anteriores medias.....2
- 2. Alas con escamas de un solo color.....3
- 3. Tarsos con manchas blancas.....10
- 10. Prosbocis sin anillo12
- 12. Todos los segmentos traciales manchados con blanco.....13
- 13. Genitalia sin claspeta; mesonoto con escamas plateadas formando un dibujo en forma de lira.....mosquito *Ae. aegypti*

Anexo. 4

PROTOCOLO PARA LA EXTRACCION DEL VIRUS DEL DENGUE

1. Separar mosquitos en tubos eppendorff (en cada tubo colocar 15 mosquitos).
2. Agregar 150 μ l. de PBS con un pH de 7.4 a los tubos con mosquitos.
3. Triturar los mosquitos con un triturador eléctrico hasta que estos se hayan deshecho bien.
4. Agregar 850 μ l. de PBS con un ph de 7.4 a estos mismos tubos para completar un volumen de 1 ml.
5. Mezclar en el vortex toda la solución por 30 seg. Aproximadamente.
6. Centrifugar por 5 min. A 10.000 rpm.
7. Extraer 150 μ l. de la muestra y agregarle a los tubos eppendorf que ya tienen 350 μ l. de β -mercaptoetanol que fueron preparados previamente para obtener una solución de 500 μ l.
8. El resto de la muestra de los tubos centrifugados separar en otros tubos eppendorf para hacer aislamiento del virus y conservarlos a -70 °C.
9. Agregar a los tubos que tienen la solución de 500 μ l. un volumen de 500 μ l. de Etanol al 70% mezclar muy bien con una pipeta. (Opcional con el vortex).
10. Transferir 500 μ l. de la muestra a la columna incluyendo algunos precipitados y centrifugar 15 seg. A 10.000 rpm.
11. Eliminar toda la solución del tubo de la columna.
12. Repetir los dos pasos anteriores con los 500 μ l. restantes.
13. Agregar a la columna 700 μ l. de buffer RW1 y centrifugar por 15 seg. A 10.000 rpm.
14. Eliminar el tubo de la columna con todo el buffer y cambiar la columna a un nuevo tubo de 2 ml.

DETERMINACIÓN DE LA EXISTENCIA DEL FENÓMENO DE TRANSMISIÓN TRANSOVÁRICA EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) DURANTE LA EPIDEMIA DE DENGUE 2007 EN LA CIUDAD DE SANTA CRUZ DE LA SIERRA - BOLIVIA.. Cruz Zambrana Mirian

15. Agregar a la columna 500 μ l. de buffer RPE y centrifugar 15 seg. A 10.000 rpm.
16. Eliminar todo el buffer.
17. Repetir los dos pasos anteriores pero centrifugando 2 min. A 10.000 rpm.
18. Pasar la columna a un nuevo tubo de 1.5 ml. Y agregar 30 o 50 μ l. de agua libre de RNasa y centrifugar 1 min. A 10.000 rpm.
19. Almacenar a -20 o a -70 °C.

Anexo. 5

RT-PCR (Reverso Transcripción- Reacción en Cadena de la Polimerasa).

REACTIVOS Y MARCA	CANTIDAD
1. Tampon PCR 5x QIAGEN One Step RT-PCR	10 ul
2. DMSO	5 ul
3. dNTPs (10mM) QIAGEN One Step RT-PCR	1 ul
4. Primer forward Dext 1 (1/20) Enrogenetec	5 ul
5. Primer reverse Dext 2 (1/20) Enrogenetec	5 ul
6. Enzima: QIAGEN One Step RT-PCR Enzime Mix	2 ul
7. Agua libre de Rnasa QIAGEN RT-PCR One Step	12 ul
8. Muestra de RNA	10 ul
TOTAL	50 ul

Procedimiento

1. Se hace un Mix de todos los reactivos, con la cantidad indicada. Primero se agrega el buffer 5x, luego el agua libre de Rnasas y enseguida todos los demas reactivos. En este orden se hace el Mix para que haya una mejor disolución.
2. Se mezcla bien el Mix en el vortex.
3. Se agrega 40 microlitros del Mix a cada tubo de RT-PCR.
4. Se agrega 10 microlitros de la muestra de RNA.
5. A cada tubo se le agrega 2 gotas de aceite mineral para proteger la solucion evitando asi que esta se evapore con la temperatura del termociclador.
6. Se colocan todos los tubos al termociclador en el programa RT-PCR Dengue y se espera.

Anexo. 6

Heminested PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

REACTIVOS Y MARCA	CANTIDAD
1. 10x Buffer QIAGEN PCR Buffer	5 ul
2. Mg Cl ₂ (25 Mm) QIAGEN	2 ul
3. dNTP Mix QIAGEN	1 ul
4. Dext 1 (1/20) Enrogenetec	5 ul
5. TS1 (1/20) Enrogenetec	5 ul
6. TS2 (1/20) Enrogenetec	5 ul
7. TS3 (1/20) Enrogenetec	5 ul
8. TS4 (1/20) Enrogenetec	5 ul
9. Agua QIAGEN	11,5 ul
10. Taq DNA Polimerase QIAGEN	0,5 ul
11. Muestra de DNA	5 ul
TOTAL	50 ul

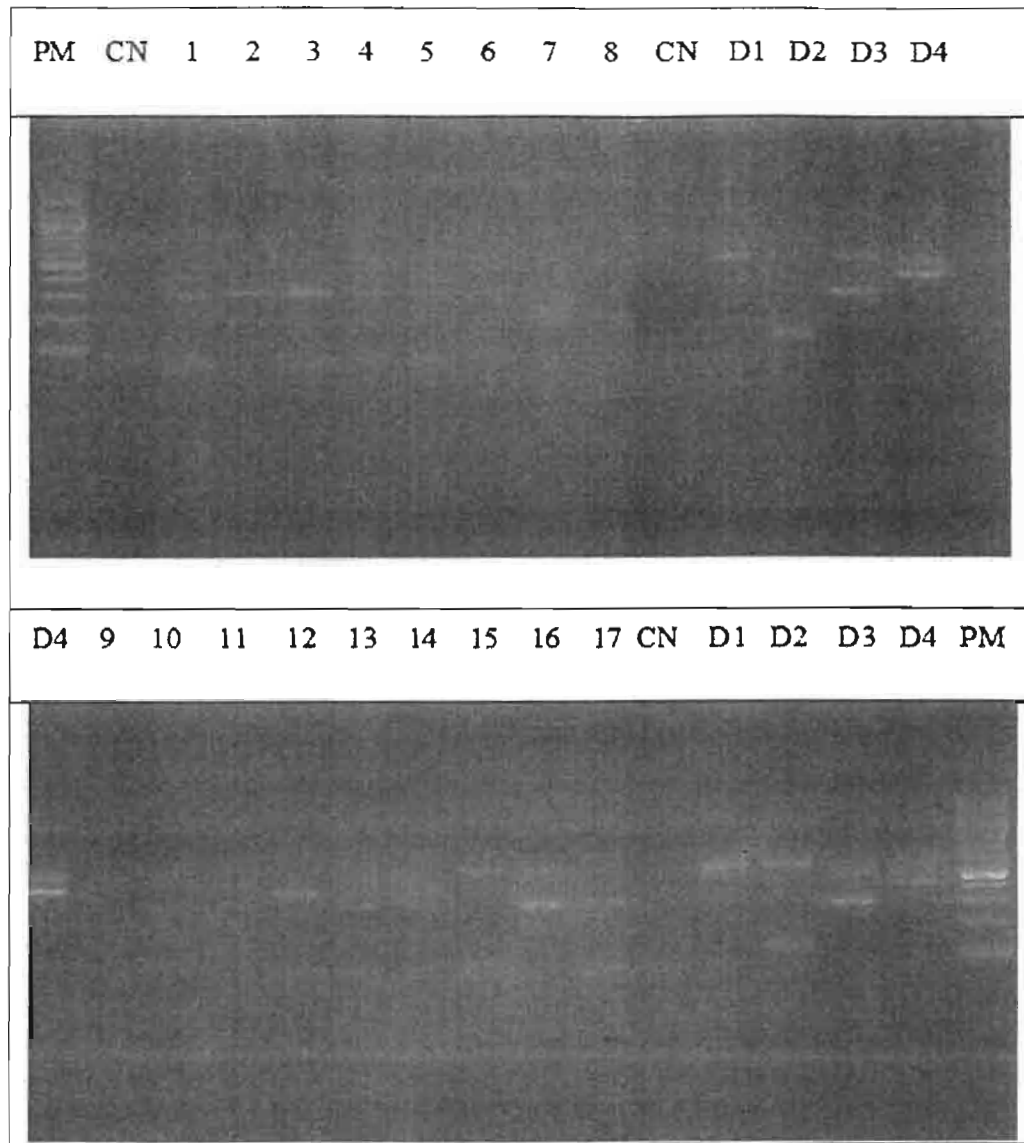
Procedimiento

1. Se hace un Mix de todos los reactivos, con la cantidad indicada para cada uno, pero siempre se comienza agregan el buffer 10x, luego el agua libre de Rnasas, siguiendo con todos los demas reactivos. Se agrega en primer lugar estos dos reactivos para que haya una mejor disolución.
2. Se mezcla bien el Mix en el vortex.
3. Se agrega a cada tubo 45 microlitros deL Mix a acad tubo de PCR.
4. Se agrega 5 microlitros del resultado del RT-PCR.

5. A cada tubo se le agrega 2 gotas de aceite mineral para proteger la solución evitando así que esta se evapore con la temperatura del termociclador.
6. Se coloca todos los tubos al termociclador en el programa PCR Taiping Dengue y se espera.

Anexo. 7

Figura 22. Resultados corridos en geles de agarosa de todas las muestras sospechosas para confirmar las positivas.



Muestras positivas para Dengue-1 = 482 pb (10, 11, 15, 16 y 17).

Muestras positivas para Dengue-3 = 290 pb (1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 13 y 14).

Anexo. 8

PROTOCOLO DE INOCULACIÓN

1. Filtrar los sobrenadantes de los mosquitos, con un filtro de 0.22 μ l.
2. Verificar en el microscopio si las células C6/36 HT están aptas para la inoculación.
3. Vacar el líquido de los frascos y lavarlos con PBS 1x estéril
4. Agregar a los frascos de las células 2 ml de Suero Bovino Fetal (SFB).
5. Agregar el sobrenadante, en un volumen de 200 μ l.
6. Llevar las células a una estufa a 34°C por un lapso de 2 horas.
7. Sacar los frascos de la estufa y desechar el FSB para agregarle 4 a 5 ml de medio de mantenimiento MEM (Minimun Essential Medium) con 2% se SFB (Suero Bovino Fetal).
8. Llevar otra vez a la estufa a 34°C y dejar por 10 días. Revisar cada día para ver si hay Efecto Citopático (ECP).
9. Al cabo de diez días todos los cultivos celulares se someten a Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para detectar el virus del dengue.

Anexo. 9

PROTOCOLO DEL SHELL VIAL

1. verificar en el microscopio si las células C6/36 HT están aptas para la inoculación.
2. Descartar el medio de crecimiento de los frascos en un recipiente estéril y rotular cada uno de ellos de acuerdo al número de muestras que se van a inocular.
3. Agregar 100 µl. de filtrado de los mosquitos a los respectivos frascos sobre la monocapa, tapar y distribuir la dilución haciendo movimientos suaves de rotación. (Evitar que los líquidos lleguen a la tapa).
4. Centrifugar por 30 minutos, a 29 °C y a 2000 rpm (rotor 244) en centrífuga refrigerada.
5. Agregar 4 a 5 ml de medio de mantenimiento MEM (Minimun Essential Médium) con 2% se SFB (Suero Bovino Fetal).
6. Incubar los frascos en una estufa a 34 °C.
7. Observar diariamente durante 10 días si se produce Efecto Citopático.
8. Al cabo de diez días todos los cultivos celulares se someten a Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para detectar el virus del dengue.

DETERMINACIÓN DE LA EXISTENCIA DEL FENÓMENO DE TRANSMISIÓN TRANSOVÁRICA EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) DURANTE LA EPIDEMIA DE DENGUE 2007 EN LA CIUDAD DE SANTA CRUZ DE LA SIERRA - BOLIVIA.. Cruz Zambrana Mirian

Anexo. 10

Tabla 3 . Lista general de mosquitos utilizados en este trabajo resaltando el origen y la técnica por la que fueron colectados.

Nº Tubo	Nº de Adultos	Código original	Sexo	Origen	PCR-Positivo	Serotipos
1	15	39	Hembras	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	40	Machos	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	40A	Machos	Ovitrapas B/ San Luís		
1	7	41	Machos	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	42	Hembras	Ovitrapas B/ San Luís		
1	18	43	Machos	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	44	Hembras	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	44A	Hembras	Ovitrapas B/ San Luís		
1	8	45	Hembras	Ovitrapas B/ San Luís		
1	13	46	Machos	Ovitrapas B/ San Luís	Positivo	DENGUE-3
1	13	47	Hembras	Ovitrapas B/ San Luís		
1	13	47A	Hembras	Ovitrapas B/ San Luís		
1	13	48	Machos	Ovitrapas B/ San Luís		
1	13	48A	Machos	Ovitrapas B/ San Luís		
1	14	49	Hembras	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	49A	Hembras	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	65	Machos	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	68	Machos	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	68A	Machos	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	69	Machos	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	69A	Machos	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	70	Machos	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	70A	Machos	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	71	Machos	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	71A	Machos	Ovitrapas B/ San Luís		
1	10	72	Machos	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	73	Hembras	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	73A	Hembras	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	74	Hembras	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	74A	Hembras	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	75	Hembras	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	75A	Hembras	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	76	Hembras	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	76A	Hembras	Ovitrapas B/ San Luís		
1	8	102	Machos	Adultos aspirados B/ San Luís		
1	4	103	Machos	Adultos aspirados B/ San Luís		
1	6	106	Machos	Adultos aspirados B/ San Luís		
1	15	202	Hembras	Encuesta Entomológica/ Florero		
1	15	202A	Hembras	Encuesta Entomológica/ Florero		
1	15	203	Hembras	Encuesta Entomológica/ Florero		
1	15	203A	Hembras	Encuesta Entomológica/ Florero		

DETERMINACIÓN DE LA EXISTENCIA DEL FENÓMENO DE TRANSMISIÓN TRANSOVÁRICA EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) DURANTE LA EPIDEMIA DE DENGUE 2007 EN LA CIUDAD DE SANTA CRUZ DE LA SIERRA - BOLIVIA.. Cruz Zambrana Mirian

1	15	204	Hembras	Encuesta Entomológica/ Florero		
1	15	204A	Hembras	Encuesta Entomológica/ Florero	Positivo	DENGUE-3
1	15	205	Hembras	Encuesta Entomológica/ Florero		
1	15	205A	Hembras	Encuesta Entomológica/ Florero		
1	3	207	Machos	Encuesta Entomológica/ Florero		
1	10	209	Machos	Encuesta Entomológica/ Florero	Positivo	DENGUE-3 y 4
1	11	209A	Machos	Encuesta Entomológica/ Florero		
1	15	210	Hembras	Encuesta Entomológica/ Llantas		
1	15	210A	Hembras	Encuesta Entomológica/ Llantas		
1	15	211	Hembras	Encuesta Entomológica/ Llantas		
1	15	211A	Hembras	Encuesta Entomológica/ Llantas		
1	15	217	Machos	Encuesta Entomológica/ Llantas		
1	15	217A	Machos	Encuesta Entomológica/ Llantas		
1	15	218	Machos	Encuesta Entomológica/ Llantas		
1	15	218A	Machos	Encuesta Entomológica/ Llantas	Positivo	DENGUE-1
1	15	222	Hembras	Encuesta Entomológica/ Llantas		
1	15	228	Machos	Encuesta Entomológica/ Llantas		
1	15	228A	Machos	Encuesta Entomológica/ Llantas	Positivo	DENGUE-3
1	15	233	Hembras	Encuesta Entomológica/ Pequeños		
1	15	233A	Hembras	Encuesta Entomológica/ Pequeños		
1	15	234	Hembras	Encuesta Entomológica/ Pequeños	Positivo	DENGUE-1
1	15	46	Hembras	Encuesta Entomológica/ Pequeños	Positivo	DENGUE-1
1	15	235	Hembras	Encuesta Entomológica/ Pequeños		
1	15	235A	Hembras	Encuesta Entomológica/ Pequeños		
1	10	238	Machos	Encuesta Entomológica/ Pequeños	Positivo	DENGUE-1
1	10	238A	Machos	Encuesta Entomológica/ Pequeños	Positivo	DENGUE-1 y 3
1	10	240	Machos	Encuesta Entomológica/ Turriles	Positivo	DENGUE-3 y 4
1	15	242	Machos	Encuesta Entomológica/ Turriles	Positivo	DENGUE-1 y 3
1	15	242A	Machos	Encuesta Entomológica/ Turriles		
1	15	243	Hembras	Ovitrapas B/ San Luis		
1	15	243A	Hembras	Ovitrapas B/ San Luis		
1	15	244	Hembras	Ovitrapas B/ San Luis	Positivo	DENGUE-1
1	15	244A	Hembras	Ovitrapas B/ San Luis		
1	15	245	Hembras	Ovitrapas B/ San Luis	Positivo	DENGUE-3
1	15	245A	Hembras	Ovitrapas B/ San Luis	Positivo	DENGUE-3
1	15	246	Hembras	Ovitrapas B/ San Luis		
1	15	246A	Hembras	Ovitrapas B/ San Luis		
1	10	247	Hembras	Ovitrapas B/ San Luis		
1	15	248	Hembras	Ovitrapas B/ San Luis		
1	15	248A	Hembras	Ovitrapas B/ San Luis		
1	15	249	Hembras	Ovitrapas B/ San Luis		
1	15	249A	Hembras	Ovitrapas B/ San Luis		
1	15	250	Hembras	Ovitrapas B/ San Luis		
1	15	250A	Hembras	Ovitrapas B/ San Luis	Positivo	DENGUE-1
1	15	253	Machos	Ovitrapas B/ San Luis		
1	15	253A	Machos	Ovitrapas B/ San Luis		
1	15	254	Machos	Ovitrapas B/ San Luis		

DETERMINACIÓN DE LA EXISTENCIA DEL FENÓMENO DE TRANSMISIÓN TRANSOVÁRICA EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) DURANTE LA EPIDEMIA DE DENGUE 2007 EN LA CIUDAD DE SANTA CRUZ DE LA SIERRA – BOLIVIA.. Cruz Zambrana Mirian

1	15	254A	Machos	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	255	Machos	Ovitrapas B/ San Luís	Positivo	DENGUE-1
1	15	255A	Machos	Ovitrapas B/ San Luís	Positivo	DENGUE-1
1	15	256	Machos	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	256A	Machos	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	257	Machos	Ovitrapas B/ San Luís	Positivo	DENGUE-3
1	15	257A	Machos	Ovitrapas B/ San Luís	Positivo	DENGUE-3 y 4
1	15	258	Machos	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	258A	Machos	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	259	Machos	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	259A	Machos	Ovitrapas B/ San Luís		
1	15	260	Machos	Ovitrapas B/ San Luís	Positivo	DENGUE-3 y 4

Total **1404**
Machos **656**
Hembras **748**

Anexo. 11

Alimentación de los mosquitos *Aedes aegypti* en sus diferentes estadios.



Figura 23. Jaulas con mosquitos adultos.

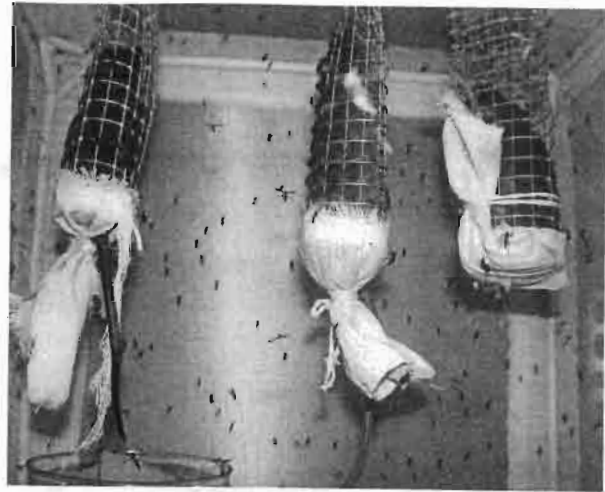


Figura 24. Alimentando adultos con ratones de laboratorio.



Figura 25. Alimentando mosquitos hembras.



Figura 26. Alimentando larvas de diferentes estadios.